

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2002年3月21日 (21.03.2002)

PCT

(10)国際公開番号
WO 02/22140 A1

(51)国際特許分類7: A61K 31/737, 35/80, A61P 43/00, 1/16, 3/08, 3/06, 35/00, 31/18, 1/04, A23L 2/52, 1/29, A23K 1/16, C08B 37/00

(21)国際出願番号: PCT/JP01/07894

(22)国際出願日: 2001年9月12日 (12.09.2001)

(25)国際出願の言語: 日本語

(26)国際公開の言語: 日本語

(30)優先権データ:
特願2000-278712 2000年9月13日 (13.09.2000) JP
特願2000-295077 2000年9月27日 (27.09.2000) JP
特願2000-342224 2000年11月9日 (09.11.2000) JP
特願2000-379313 2000年12月13日 (13.12.2000) JP
特願2001-128295 2001年4月25日 (25.04.2001) JP
特願2001-179335 2001年6月13日 (13.06.2001) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 寶酒
造株式会社 (TAKARA SHUZO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒
612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto
(JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 西山英治
(NISHIYAMA, Eiji) [JP/JP]; 〒524-0102 滋賀県守

山市水保町1411-7 Shiga (JP). 佐川裕章 (SAGAWA,
Hiroaki) [JP/JP]; 〒525-0025 滋賀県草津市西渋川
二丁目6-32 Shiga (JP). 日野文嗣 (HINO, Fumitsugu)
[JP/JP]; 〒525-0028 滋賀県草津市上笠3-9-8 Shiga (JP).
森原悦子 (MORIHARA, Etsuko) [JP/JP]; 〒520-2141
滋賀県大津市大江五丁目11-11-303 Shiga (JP). 酒
井 武 (SAKAI, Takashi) [JP/JP]; 〒036-8183 青森
県弘前市品川町120-1-203 Aomori (JP). 大屋敷春夫
(OYASHIKI, Haruo) [JP/JP]; 〒520-2276 滋賀県大
津市里七丁目13-15 Shiga (JP). 加藤郁之進 (KATO,
Ikunoshin) [JP/JP]; 〒611-0028 京都府宇治市南陵町
1-1-150 Kyoto (JP).

(74)代理人: 弁理士 細田芳徳 (HOSODA, Yoshinori);
〒540-6591 大阪府大阪市中央区大手前一丁目7番31
号 OMMビル5階私書箱26号 細田国際特許事務所内
Osaka (JP).

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84)指定国(広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,

[締葉有]

(54)Title: HOMEOSTASIS-MAINTAINING AGENTS

(54)発明の名称: 恒常性維持剤

(57)Abstract: Biological homeostasis-maintaining agents, foods, drinks or feeds which comprise fucoidan, its decomposition products of salts thereof and have an effect of maintaining the homeostasis of living bodies. Fucoidan and marine algae extracts which are less colored, have relieved bitterness and a smaller iodine content and show a fresh feel; foods, drinks, seasonings, feeds, cosmetics or drugs containing the above-mentioned fucoidan and/or marine algae extracts; and a process for efficiently producing the same.

(57)要約:

本発明は、フコイダン、その分解物又はそれらの塩を利用した、生体の恒常性
維持作用を有する生体の恒常性維持剤、食品、飲料又は飼料を提供する。
また、本発明は、着色が少なく、苦味やヨード含量が軽減され、フレッシュ感
のある、風味が改善されたフコイダン及び海藻類抽出物、当該フコイダン及び/
又は海藻類抽出物を含有する食品、飲料、調味料、飼料、化粧品又は医薬、及び
それらの効率的な製造方法を提供する。

WO 02/22140 A1



AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:
— 国際調査報告書

明細書

恒常性維持剤

技術分野

本発明は、生体の恒常性維持作用を有する医薬、食品、飲料または飼料に関する。

また、本発明は、風味が改善されたフコイダン及び海藻類抽出物、当該フコイダン及び／又は海藻類抽出物を含有する食品、飲料、調味料、飼料、化粧料又は医薬、及びそれらの製造方法に関する。

背景技術

海藻類には褐藻類、緑藻類、紅藻類などがある。このうち褐藻類には、コンブ、ワカメ、モズク、ヒジキ等、味も良く健康にも良いとされる海藻が多く、古くから人類の食物として大量に利用されてきた。これらの褐藻類は毎日かなりの量を摂取しても、みるべき障害がないことから、食品としての安全性は極めて高い。また褐藻類は中国においてがんの治療薬として使われ、多くの研究者が褐藻類から抗がん作用を示す物質を同定しようと試みてきた。褐藻類からの熱水抽出物中に存在するフコイダンは硫酸化フコースを含有する硫酸化多糖の一種である。天然のフコイダンは分子量が数十万あるいはそれ以上あり、親水性の高い硫酸基と、疎水性の高いメチル基など相反する性質の化学構造を併せ持つため、海藻に含まれる様々な成分を吸着し易く、精製が非常に困難な物質である。近年、フコイダンの生理機能として、抗がん作用、アポトーシス誘発作用、血圧低下作用、抗アレルギー作用等が明らかになってきていることから、その有用性は高まっており、医薬品および健康食品としての用途開発が期待されている。また、フコイダンは、食品、飲料、飼料、化粧料又は医薬の有効成分としてこれらの生

理機能を十分に発揮することから、簡便で高効率な高純度フコイダンの調製方法の開発が望まれている。

また、海藻類は、食材や調味料のだしとして一般に多用されている。例えば、食用として根コンブを軽く水洗いし、水中に入れ1~2時間程抽出して、コンブのエキスが出たコンブ水として用いたり、またコンブだしを取るため、温水で煮て、旨味であるグルタミン酸に富むだしを調製したりする。海藻類はアミノ酸、ミネラル類や粘質多糖を含み、これらの成分を抽出して食品や調味料へ利用している。しかし、海藻類には苦味成分が含まれており、水や温水抽出で液部へ溶出される。また、これ以外にも海藻類に特有な香り成分や味成分があり、また煮出し時に着色成分がさらに増加する。海藻類の抽出は冷水及び温水においても、粘質多糖、ミネラル類やヨード分、及び海藻臭が抽出液へ移行するので、苦味や過度にヨードが抽出され、食材としての使用においても、海藻臭が好まれない食品や調味料としては使用しづらい。現代人の健康には、粘質多糖やミネラル類を摂取することは重要であり、海水飲料が好まれて飲用されているが、嗜好の面からは苦味を軽減させる事が重要で、特に海藻臭を防止した食品、飲料及び調味料の開発が望まれている。

苦味、渋味及び過度の着色成分の除去は、一般に用いられている化学反応によるイオン交換樹脂や物理的吸着による活性炭処理等が汎用され効果を示すが、これらの方法は、海藻類の本来の香味成分も過度に除去され、着色の色彩も変化する。従って、手作りの海藻類の水抽出物や煮出し汁の香味からかけ離れた品質、風味となる。その結果、素朴な手作り感を残した、本格的な海藻類抽出液が得られず、それを生かした食品、飲料、調味料又は飼料も知られていない。

発明の開示

本発明はフコイダンの新たな生理作用を見出すことにあり、その目的はフコイダン、その分解物又はそれらの塩を利用した、生体の恒常性維持作用を有する生

体の恒常性維持剤、食品、飲料または飼料を提供することにある。

また、本発明の目的は、着色が少なく、苦味やヨード含量が軽減され、フレッシュ感のある、風味が改善されたフコイダン及び海藻類抽出物、当該フコイダン及び／又は海藻類抽出物を含有する食品、飲料、調味料、飼料、化粧料又は医薬、及びそれらの効率的な製造方法を提供することにある。

すなわち、本発明の要旨は、

- (1) フコイダン、その分解物及びそれらの塩からなる群より選択される1つ以上を有効成分として含有することを特徴とする生体の恒常性維持剤、
- (2) フコイダン、その分解物及びそれらの塩からなる群より選択される1つ以上を含有することを特徴とする生体の恒常性維持用の食品、飲料又は飼料、
- (3) 海藻類を還元性物質の存在下で抽出して得られるフコイダン、
- (4) 海藻類を還元性物質の存在下で抽出して得られる海藻類抽出物、
- (5) 前記(3)記載のフコイダン及び／又は前記(4)記載の海藻類抽出物を含有してなることを特徴とする食品、飲料、調味料又は飼料、
- (6) 前記(3)記載のフコイダン及び／又は前記(4)記載の海藻類抽出物を含有してなることを特徴とする化粧料、
- (7) 前記(3)記載のフコイダン及び／又は前記(4)記載の海藻類抽出物を有効成分として含有してなることを特徴とする医薬、
- (8) 海藻類を還元性物質の存在下で抽出する工程を包含することを特徴とするフコイダンの製造方法、
- (9) 海藻類を還元性物質の存在下で抽出する工程を包含することを特徴とする海藻類抽出物の製造方法、
- (10) 前記(8)において記載の工程及び／又は前記(9)において記載の工程を包含することを特徴とする食品、飲料、調味料又は飼料の製造方法、
- (11) 前記(8)において記載の工程及び／又は前記(9)において記載の工程を包含することを特徴とする化粧料の製造方法、ならびに

(12) 前記〔8〕において記載の工程及び／又は前記〔9〕において記載の工程を包含することを特徴とする医薬の製造方法、に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、ガゴメコンブ由来フコイダンのDEAE-セルロファインA-80カラム溶出パターンを示す図である。

第2図は、フコイダンによる食後のラットの血糖値上昇抑制作用を示す図である。

第3図は、フコイダンによる食後のラットの血中中性脂肪値上昇抑制作用を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の第1の態様は、フコイダン、その分解物及びそれらの塩からなる群より選択される1つ以上を有効成分として含むことを1つの大きな特徴とする、生体の恒常性維持剤、生体の恒常性維持用の食品、飲料ならびに飼料を提供するものである。本発明の所望の効果の発現は、本発明者らが見出した当該有効成分により発揮される生体の恒常性維持作用に基づくものである。

本明細書において、かかる生体の恒常性維持作用とは、すなわち、生体を維持するために、生命維持の機能を一定の状態に維持する作用をいうものであり、特に肝機能の恒常性維持作用および血液の恒常性維持作用をいう。それらの作用の詳細については後述する。なお、維持には、一定の状態を保つ、という意の他、一定の状態を保つように調節する、という意を含む。

本発明において有効成分として使用するフコイダンとは硫酸化フコースを構成成分として含む硫酸化フコース含有多糖であり、生体の恒常性維持作用を有していればよく、特に限定はない。例えば、藻類、例えば、ガゴメコンブ、トロロコ

ンブ、ワカメ、クロメ、アラメ、カジメ、ジャイアントケルプ、レッソニア ニゲレセンス、モズク、オキナワモズク、ヒバマタ、アスコフィラム ノドッサム等のコンブ目、ナガマツモ目、ヒバマタ目等の褐藻類に属する海藻は特に生体の恒常性維持作用を有するフコイダンを多く含んでおり、原料として好適である。また、原料としては棘皮動物、例えばナマコ、ウニ、ヒトデ等を用いてもよく、それらに由来するフコイダンも好適に使用することができる。中でも、コンブ目の海藻は優れた生体の恒常性維持作用を有するフコイダンを多く含んでおり、原料としてより好適である。従って、本発明の有効成分として使用されるフコイダンとしては藻類由来または棘皮動物由來のものが好ましく、褐藻類由來のものがより好ましい。

これらのフコイダンの調製はそれぞれ公知の方法で行えば良く、粗調製物、精製物又はいくつかの分子種に分けたフコイダン等を本発明に使用することができる。

例えばガゴメコンブからフコイダンを調製し、該フコイダンからグルクロン酸含有フコイダン（以下、U-フコイダンと称す）とグルクロン酸非含有フコイダン（以下、F-フコイダンと称す）を分離することができ、本発明の有効成分としてそれぞれのフコイダンを使用することが出来る。また、ガゴメコンブから硫酸化フコガラクタン（以下、G-フコイダンと称す）を調製し、使用することができる。

U-フコイダン及びF-フコイダンは、例えばガゴメコンブからフコイダンを調製後、陰イオン交換樹脂、界面活性剤等を用いて分離される。ガゴメコンブ由來のU-フコイダン及びF-フコイダンの存在比は約1：2であり、U-フコイダンはフコース、マンノース、ガラクトース、グルクロン酸等を含み、硫酸含量は約20%、F-フコイダンはフコースとガラクトースを含み、硫酸含量は約50%、分子量は両物質共に約20万を中心に分布している（第18回糖質シンポジウム要旨集、第159頁、1996年）。

例えばガゴメコンブから調製したフコイダン溶液をDEAE-セルロファインA-800カラムにアプライ後、塩化ナトリウム含有緩衝液にて濃度勾配法により溶出させることにより、U-フコイダンとF-フコイダンに分離することができる。第1図にその1例を示す。すなわち第1図はU-フコイダンとF-フコイダンの分離を示す図であり、図中前ピークがU-フコイダン、後ピークがF-フコイダンである。

また例えばモズク由来フコイダン、オキナワモズク由来フコイダン、ワカメ由来フコイダン、ワカメ メカブ由来フコイダン、ヒバマタ由来フコイダンもそれぞれ公知の方法で調製し、本発明に使用することができる。

フコイダンを含有するナマコとしては、例えば特開平4-91027号公報に記載のナマコがあり、当該公報記載の方法にてナマコよりフコイダンを調製することができる。また、市販のフコイダンを使用することもできる。また、上記フコイダンは所望により適宜硫酸化して使用することもでき、硫酸化の方法は公知の方法に従えばよい。

本発明において有効成分として使用するフコイダンの分解物（以下、本発明の分解物と称することがある）は、酵素学的方法、化学的方法、物理学的方法等の公知の方法にてフコイダンを分解し、生体の恒常性維持作用を指標として所望の分解物を選択することにより得られる。また、本発明で使用するフコイダンの分解物は所望により適宜硫酸化して使用することもでき、硫酸化の方法は公知の方法に従えばよい。

本発明で使用するフコイダンの分解物の調製方法としては、例えば酸分解法があり、当該フコイダンを酸分解することにより、生体の恒常性維持作用を有する分解物を調製することができる。

本発明で使用するフコイダンの酸分解条件は、生体の恒常性維持作用を有する分解物が生成する条件であれば、特に限定はない。例えばフコイダンを酸水溶液等に溶解または懸濁し、酸分解反応を行うことにより、本発明の分解物が生成す

る。また、反応時に加熱することにより、本発明の分解物の生成に必要な時間が短縮される。フコイダンの酸分解に使用できる酸としては、特に限定するものではないが、塩酸、硫酸、硝酸等の無機酸、クエン酸、ギ酸、酢酸、乳酸、アスコルビン酸等の有機酸、また陽イオン交換樹脂、陽イオン交換纖維、陽イオン交換膜等の固体酸が挙げられる。

酸の濃度も特に限定はないが、好ましくは0.0001～5規定、より好ましくは0.01～1規定程度の濃度で使用可能である。また、反応温度も特に限定は無いが、好ましくは0～200°C、より好ましくは20～130°Cに設定すれば良い。

また、反応時間も特に限定するものではないが、好ましくは数秒～数日間に設定すれば良い。酸の種類と濃度、反応温度及び反応時間は、本発明の分解物の生成量、分解物の重合度により適宜選択すれば良い。例えば、本発明の分解物の製造に際しては、クエン酸、乳酸、リンゴ酸等の有機酸を使用し、酸の濃度は数10mM～数M、加熱温度は50～110°C、好適には70～95°C、加熱時間は数分～24時間の範囲から適宜選択することにより、本発明の分解物を調製することができる。フコイダンの酸分解物としてはガゴメコンブ由来フコイダンの酸分解物が例示され、当該分解物は生体の恒常性維持作用を有する食物纖維としても使用することができる。

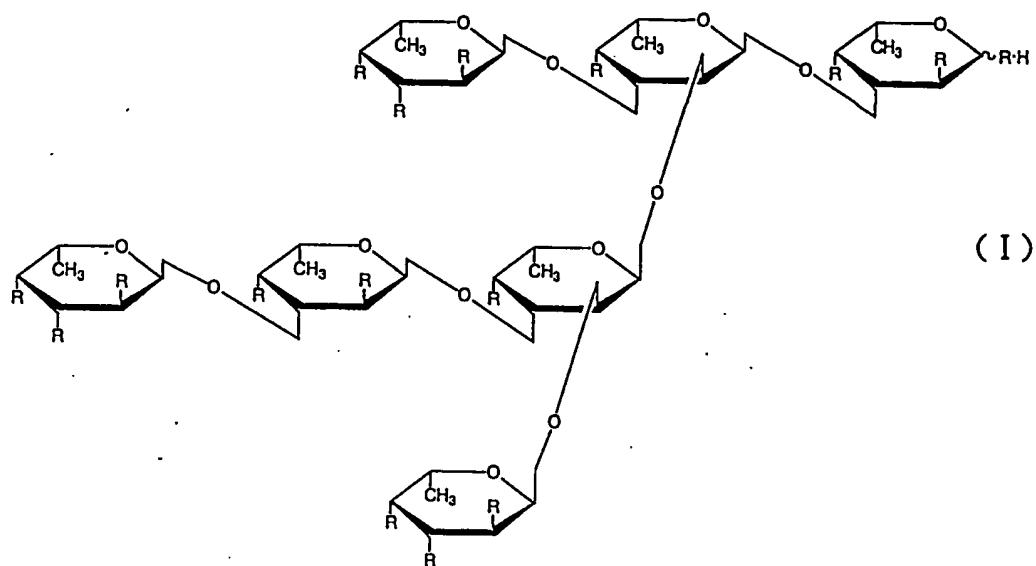
本発明の分解物は、生体の恒常性維持作用を指標として分画することができ、例えば酸分解物をゲルろ過法、分子量分画膜による分画法等により分子量分画することができる。

ゲルろ過法の例としては、セルロファインGCL-300（生化学工業社製）を使用し、例えば分子量25000超、分子量25000～10000超、分子量10000～5000超、分子量5000以下等の任意の分子量画分を調製でき、セルロファインGCL-25（生化学工業社製）を用い、例えば分子量5000以下の画分を分子量5000～3000超、分子量3000～2000超、

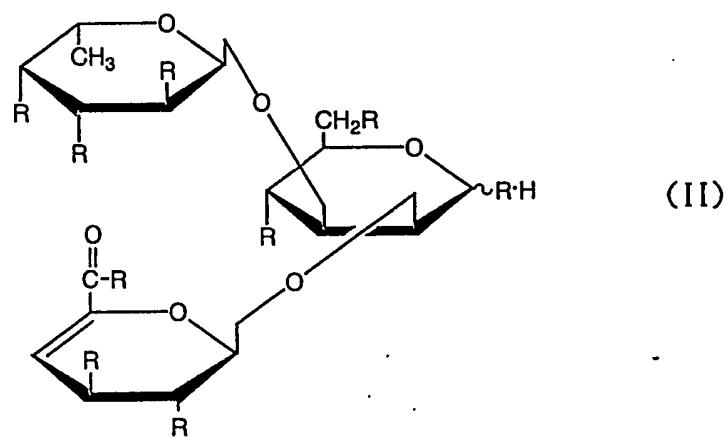
分子量2000～1000超、分子量1000～500超、分子量500以下等の任意の分子量画分に調製することができる。

また、本発明の分解物は、限外ろ過膜を用いて工業的に分子量分画を行うことができ、例えばダイセル社製FE 10-FUSO 382を用いることにより分子量3000以下の中分を、同FE-FUS-T 653を使用することによって分子量6000以下の画分を調製することができる。更にナノフィルター膜を用いることにより分子量500以下の画分を得ることもでき、これらのゲルろ過法、分子量分画法を組み合せることにより、任意の分子量画分を調製することができる。

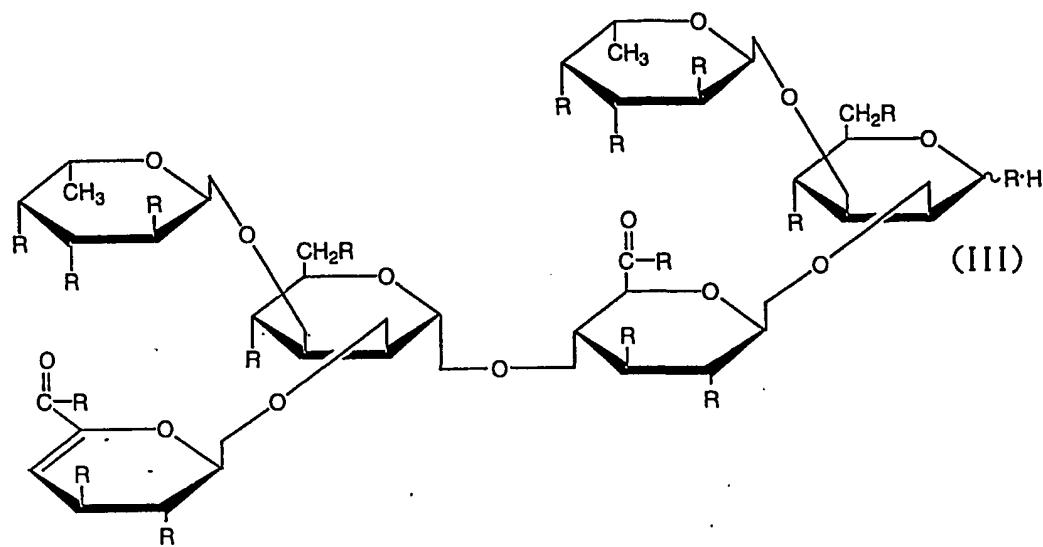
本発明に使用できる生体の恒常性維持作用を有するフコイダンの分解物としては、下記式(I)～(IV)で表される化合物が例示され、これらの化合物は国際公開第97/26896号パンフレット、国際公開第99/41288号パンフレット、国際公開第00/50464号パンフレットに記載の方法で調製することができる。また、本発明の分解物としては、国際公開第97/26896号パンフレット、国際公開第99/41288号パンフレット、国際公開第00/50464号パンフレットに記載のフコイダンの分解物も例示される。



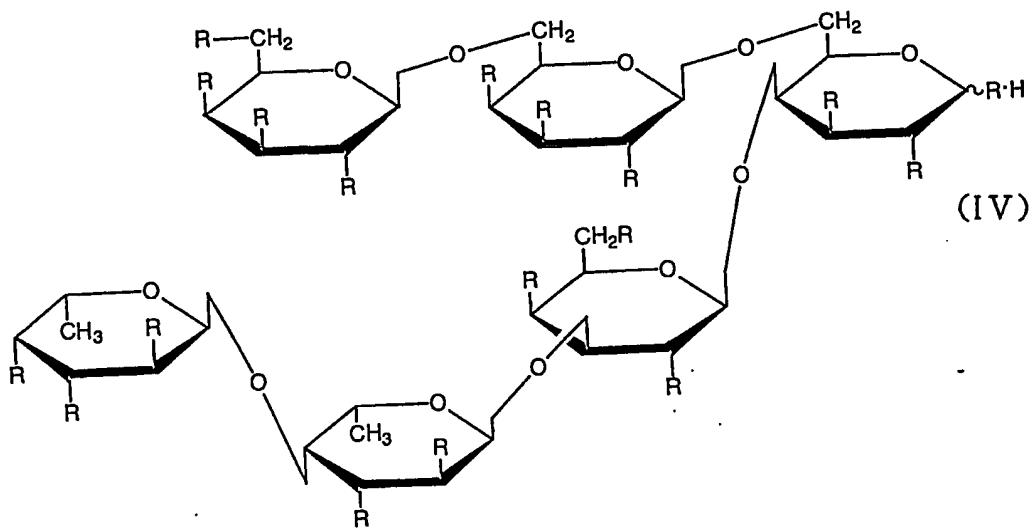
(式中、RはOH又はOSO₃Hである。)



(式中、RはOH又はOSO₃Hである。)



(式中、RはOH又はOSO₃Hである。)



(式中、RはOH又はOSO₃Hである。)

なお、式(I)で表される化合物の例としては後述の式(V)で表される化合物が、式(II)で表される化合物の例としては後述の式(VI)および式(VII)で表される化合物が、式(III)で表される化合物の例としては後述の式(VIII)で表される化合物が挙げられる。

式(I)で表される化合物は、例えば前出F-フコイダンを、アルテロモナス s p. SN-1009 (FERM BP-5747) が产生するエンド型硫酸化多糖分解酵素 (F-フコイダン特異的分解酵素) で分解し、得られた分解物より精製することにより得ることができる。当該化合物中の硫酸基の含量、部位についてはその分解物中より、任意のものを精製することができる。また当該分解物中には式(I)で表される化合物の多量体も含有されており、目的に応じて分離、精製することができる。

式(II)、式(III)で表される化合物は、例えば前出U-フコイダンを、ラボバクテリウム s p. SA-0082 (FERM BP-5402) が产生するエンド型硫酸化多糖分解酵素 (U-フコイダン特異的分解酵素) を用いて分解し、得られた分解物より精製することにより得ることができる。当該化合物中の硫酸基の含量、部位についてはその分解物中より、任意のものを精製することができる。また当該分解物中には各々式(II)または式(III)で表される化合物を基本骨格とする、その多量体も含有されており、目的に応じて分離、精製することができる。

ガゴメコンブ由来フコイダンをアルテロモナス s p. SN-1009 (FERM BP-5747) が产生するF-フコイダン特異的分解酵素、及びラボバクテリウム s p. SA-0082 (FERM BP-5402) が产生するU-フコイダン特異的分解酵素で分解し、得られた分解物を精製して、前出G-フコイダンを調製することができる。

前記ラボバクテリウム s p. SA-0082 (FERM BP-5402) はこのG-フコイダンを特異的に分解するエンド型硫酸化多糖分解酵素 (G-フコイダン特異的分解酵素) をも产生する。当該G-フコイダン特異的分解酵素をG-フコイダンに作用させることにより、当該G-フコイダンの分解物を調製し、目的に応じて分解物を精製し、当該分解物中より本発明において有効成分として使用しうる分解物を調製することもできる。式(IV)で表される化合物は

その例である。当該化合物中の硫酸基の含量、部位についてはその分解物中より、任意のものを精製することができる。また当該分解物中には式(IV)で表される化合物を基本骨格とする、その多量体も含有されており、目的に応じて分離、精製することができる。

なお、上記各酵素については、国際公開第97/26896号パンフレット又は国際公開第00/50464号パンフレットに記載されている。また、上記のF-フコイダン特異的分解酵素、U-フコイダン特異的分解酵素、G-フコイダン特異的分解酵素はそれぞれ公知の方法でこれらの遺伝子を単離し、組み換え体を作製して酵素を調製し、使用することもできる。例えば、F-フコイダン特異的分解酵素及びU-フコイダン特異的分解酵素については国際公開第99/11797号パンフレット記載の方法で組み換え体より調製し、使用することもできる。

前記フコイダンの特定の分画物、特にF-フコイダン、U-フコイダン、G-フコイダンはその基本構造が初めて明確となったフコイダン分画物であり、各分画物に特異的に作用する酵素を用いて調製される各分解物、特にその分解物の分画物、例えば上記式(I)～式(IV)等の化合物は、フコイダンと比較して分子量が小さく、かつフコイダンと同等の生理活性を有するという点において、構造、組成、物性が不明確な単に分離されたフコイダンもしくはフコイダン含有物に比べて顕著に優れる。

本発明において有効成分として使用されるフコイダンまたはその分解物の塩としては、例えば、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、有機塩基等との塩が例示される。例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウム、またはジエタノールアミン、エチレンジアミン等との塩が挙げられる。これらの塩は、例えば、フコイダン等に存在する硫酸基やカルボキシル基を公知の方法により塩に変換することで得られる。かかる塩としては薬理学的に許容されうる塩が好ましい。

さらに、本発明の第1の態様においては、後述する本発明の第2の態様の説明において詳細に記載する、本発明の海藻類抽出物の製造方法に従って得られうるものであって、生体の恒常性維持作用を有するフコイダン、ならびにその分解物及びそれらの塩を有効成分として好適に使用することができる。当該フコイダンは、所望の原料より還元性物質の存在下に抽出することによる、高純度かつ高収率なフコイダンの製造方法により得られるもので、従来のフコイダンの製造方法により得られるフコイダンと比較して外観の色が薄く、海藻臭も低減されているという性質を有しており、本発明の態様における有効成分としてより好ましいものである。当該フコイダンの製造方法は、原料として前記したような、フコイダンを含有することが知られる、またはフコイダンを含有すると考えられる海藻類（好適には褐藻類）を用いることを除いて、原料の処理条件や原料からの目的物質の抽出条件等は、後述の海藻類抽出物の製造方法と同様である。当該フコイダン（以下、還元抽出フコイダンという場合がある）及びその製造方法は本発明に包含される。

なお、本発明の有効成分の生体の恒常性維持作用の発現は後述の実施例に記載の方法により評価することができる。例えば、肝機能の恒常性維持作用については実施例1～4に記載の方法により評価することができる。また、血液の恒常性維持作用については実施例5～6に記載の方法により評価することができる。

本発明の第1の態様における、医薬としての生体の恒常性維持剤は、生体の恒常性の変調によって生ずる疾患や病態（あるいは生体の恒常性維持を要する疾患や病態）を、前記有効成分の生体の恒常性維持作用により予防又は治療する医薬など、当該作用に基づいて薬理効果を発揮する全ての医薬を包含するものである。中でも、当該有効成分は、肝機能の恒常性維持作用及び血液の恒常性維持作用に優れており、本発明の態様において好適には、肝機能障害の治療剤又は予防剤としての、あるいは血液の恒常性維持剤としての、生体の恒常性維持剤が提供される。

本発明の有効成分が有する肝機能の恒常性維持作用とは、具体的には肝機能障害の治療又は予防作用をいうものであり、従って、本発明の恒常性維持剤は肝機能の恒常性の変調によって生ずる疾患や病態、特に肝機能障害の治療又は予防に有効である。

肝機能障害の治療剤又は予防剤としての、本発明の恒常性維持剤（以下、本発明の肝機能障害の治療剤または予防剤と称することがある）の治療又は予防の対象となる肝機能障害としては、特に限定はないが、例えば急性肝炎、劇症肝炎、アルコール性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝がん等が例示され、好適には肝線維化を伴う疾患である慢性肝炎、アルコール性肝炎または肝硬変が例示される。さらに、これらの障害を経て発症する肝がんも肝線維化を伴う疾患として包含される。

肝線維化は慢性肝炎、アルコール性肝炎、肝硬変において見られる肝臓にコラーゲンなどの結合組織の増生及び蓄積をきたした病態である。従って、肝線維化を抑制することで前記疾患の治療または予防を行うことができる。一方、慢性肝炎、肝硬変が悪化すると肝がんへと進行する危険率が高くなる。このことから肝線維化を抑制することは肝がんの治療又は予防においても極めて有用である。

また、これらの肝機能障害の原因因子としては、特に限定はなく、ウィルス、自己免疫、薬物、アルコール、栄養障害、先天性代謝異常、循環障害等の原因因子があり、これらのいずれの原因による肝機能障害についても、本発明の恒常性維持剤を使用することができる。また、本発明の有効成分は後述の実施例 3 及び 4 に示すように、アルコール性の肝機能障害に対しても特に有用である。

一方、本発明の有効成分が有する血液の恒常性維持作用とは、例えば生活習慣病（特に糖尿病、肥満症、高脂血症）の原因となる血糖値や血中の中性脂肪値の上昇を抑制する、あるいは上昇した血糖値や血中の中性脂肪値を低下させる、等の作用、すなわち、血糖値上昇抑制作用や血中の中性脂肪値上昇抑制作用等をいうものである。なお、抑制には調節の意を含む。本発明の有効成分は、特に血液

の恒常性維持作用として具体的に記載した前記作用に優れ、従って、本発明により、それらの作用を有する生体の恒常性維持剤が提供される。当該恒常性維持剤によれば、血糖値や血中の中性脂肪値の上昇を抑制し、もしくは上昇した血糖値や血中の中性脂肪値を低下させ、生活習慣病、特に糖尿病、肥満症、高脂血症の予防又は治療を行うことができる。また、本発明の有効成分は飲食後における血糖値および血中の中性脂肪値の上昇を抑制する作用をも有しており、それゆえ、本発明により、飲食後の血液の恒常性維持剤としての生体の恒常性維持剤が提供される。かかる恒常性維持剤は、食事制限される糖尿病患者、肥満症患者、高脂血症患者の治療又は予防にとって非常に有用である。なお、本明細書において中性脂肪としてはモノグリセリド、ジグリセリド、及びトリグリセリド等が例示される。

次に、本発明の恒常性維持剤の製造方法について説明する。本発明の生体の恒常性維持剤は、フコイダン、その分解物、及びそれらの塩からなる群より選択される一つ以上を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せて製剤化すれば良い。当該製剤の製造は一般的には、本発明の有効成分を薬学的に許容できる液状又は固体状の担体と配合し、所望により溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。また、これを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品や、外用剤とすることもできる。

医薬用担体は、本発明の恒常性維持剤の投与形態及び剤型に応じて選択することができ、経口剤の場合は、例えばデンプン、乳糖、白糖、マンニット、カルボキシメチルセルロース、コーンスターク、無機塩等が利用される。また経口剤の調製に当っては、更に結合剤、崩壊剤、界面活性剤、潤沢剤、流動性促進剤、矫味剤、着色剤、香料等を配合することもできる。

一方、非経口剤の場合は、常法に従い本発明の有効成分を希釈剤としての注射

用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、ラッカセイ油、ダイズ油、トウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等に溶解ないし懸濁させ、所望により殺菌剤、安定剤、等張化剤、無痛化剤等を加えることにより調製することができる。

外用剤としては、経皮投与用の固体、半固体又は液状の製剤が含まれる。また、座剤等も含まれる。例えば、乳剤、ローション剤等の乳濁剤、外用チンキ剤等の液状製剤、油性軟膏、親水性軟膏等の軟膏剤、フィルム剤、テープ剤、パップ剤等の経皮投与用の貼付剤等とすることもできる。

本発明の恒常性維持剤は、適宜、製薬分野における公知の方法により製造することができる。該恒常性維持剤における有効成分の含有量は、投与形態、投与方法等を考慮し、当該製剤を用いて好ましくは後述の投与量範囲で当該有効成分を投与できるような量であれば特に限定されるものではない。

本発明の生体の恒常性維持剤は、製剤形態に応じた適当な投与経路で投与することができる。投与方法も特に限定はなく、内用、外用及び注射によることができる。注射剤は、例えば静脈内、筋肉内、皮下、皮内等に投与し得、外用剤には座剤等も包含される。

本発明の生体の恒常性維持剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的及びこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され一定ではないが、一般には製剤中に含有される有効成分の量で、好ましくは成人1日当たり0.1～2000mg/kgである。もちろん投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。本発明の恒常性維持剤はそのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。また、フコイダン、その分解物、及び／又はそれらの塩を生体の恒常性維持用飲食品の原料として用いても良い。

また、本発明の有効成分として使用する、フコイダン、その分解物及び／又は

それらの塩は、その生体の恒常性維持作用により、生体の恒常性維持に関する、例えば肝機能障害の発生、血糖値上昇もしくは血中の中性脂肪値上昇抑制のメカニズムの研究や、肝機能改善剤、血糖値上昇抑制剤、血中の中性脂肪値上昇抑制剤のスクリーニングにも有用である。

また、本発明の別の態様として、本発明の前記有効成分を個体に投与する、生体の恒常性維持方法を提供する。かかる方法は、肝機能障害の治療又は予防、あるいは血液の恒常性維持にとって特に有用である。個体に投与するフコイダンとしては藻類由来又は棘皮動物由来であるものが好ましく、藻類としては褐藻類であるのが好ましい。また、特に前記還元抽出フコイダンを投与するのが好適である。なお、個体とは哺乳動物、中でもヒトである。

かかる方法は、例えば、生体の恒常性維持が必要であると予想される、またはその必要のあるヒトに対し、前記有効成分を、好ましくは本発明の恒常性維持剤として投与することにより行うことができる。有効成分の投与方法、投与量等は、当該有効成分の投与に使用する本発明の恒常性維持剤の投与方法、投与量などに従えばよい。なお、本態様においては、後述する食品、飲料または飼料を用いることもできる。

続いて、本発明の有効成分を含有してなる本発明の食品、飲料または飼料（以下、本発明の生体の恒常性維持用食品、飲料または飼料と称することがある）を説明する。本発明の食品、飲料または飼料は、有効成分の有する生体の恒常性維持作用により、当該有効成分に感受性を示す生体の恒常性維持に有効であり、従って、恒常性維持を要する疾患の改善、予防に極めて有用である。本発明により、前記恒常性維持剤と同様の作用及び効果を有する、食品、飲料又は飼料が提供される。好適な態様についても前記恒常性維持剤と同様である。

なお、本発明の食品、飲料または飼料にいう「含有」の語は、含有、添加、希釈の意を含むものであり、含有とは食品、飲料または飼料中に本発明で使用される有効成分が含まれるという態様を、添加とは食品、飲料または飼料の原料に、

本発明で使用される有効成分を添加するという態様を、希釈とは本発明で使用される有効成分に、食品、飲料または飼料の原料を添加するという態様をいうものである。

本発明の生体の恒常性維持用の食品または飲料の製造法は、特に限定はないが、調理、加工及び一般に用いられている食品または飲料の製造法による製造を挙げることができ、製造された食品または飲料に生体の恒常性維持作用を有するフコイダン、その分解物、及び／又はそれらの塩が有効成分として含有、添加及び／又は希釈されていれば良い。

本発明の生体の恒常性維持用食品又は飲料とは、特に限定はないが、例えば穀物加工品（小麦粉加工品、デンプン類加工品、プレミックス加工品、麵類、マカロニ類、パン類、あん類、そば類、麩、ビーフン、はるさめ、包装餅等）、油脂加工品（可塑性油脂、てんぷら油、サラダ油、マヨネーズ類、ドレッシング等）、大豆加工品（豆腐類、味噌、納豆等）、食肉加工品（ハム、ベーコン、プレスハム、ソーセージ等）、水産製品（冷凍すりみ、かまぼこ、ちくわ、はんぺん、さつま揚げ、つみれ、すじ、魚肉ハム、ソーセージ、かつお節、魚卵加工品、水産缶詰、つくだ煮等）、乳製品（原料乳、クリーム、ヨーグルト、バター、チーズ、練乳、粉乳、アイスクリーム等）、野菜・果実加工品（ペースト類、ジャム類、漬け物類、果実飲料、野菜飲料、ミックス飲料等）、菓子類（チョコレート、ビスケット類、菓子パン類、ケーキ、餅菓子、米菓類等）、アルコール飲料（日本酒、中国酒、ワイン、ウイスキー、焼酎、ウォッカ、ブランデー、ジン、ラム酒、ビール、清涼アルコール飲料、果実酒、リキュール等）、嗜好飲料（緑茶、紅茶、ウーロン茶、コーヒー、清涼飲料、乳酸飲料等）、調味料（しょうゆ、ソース、酢、みりん等）、缶詰・瓶詰め・袋詰め食品（牛飯、釜飯、赤飯、カレー、その他の各種調理済み食品）、半乾燥又は濃縮食品（レバーペースト、その他のスプレッド、そば・うどんの汁、濃縮スープ類）、乾燥食品（即席麵類、即席カレー、インスタントコーヒー、粉末ジュース、粉末スープ、即席味噌汁、

調理済み食品、調理済み飲料、調理済みスープ等)、冷凍食品(すき焼き、茶碗蒸し、うなぎかば焼き、ハンバーグステーキ、シュウマイ、餃子、各種スティック、フルーツカクテル等)、固形食品、液体食品(スープ等)、香辛料類等の農産・林産加工品、畜産加工品、水産加工品等が挙げられる。

本発明の食品又は飲料における本発明の有効成分の含有量は特に限定されず、その官能と作用発現の観点から適宜選択できるが、例えば、食品100重量部当たり好ましくは0.0001重量部以上、より好ましくは0.001~10重量部であり、たとえば、飲料100重量部当たり好ましくは0.0001重量部以上、より好ましくは0.001~10重量部である。

また、本発明により、本発明の有効成分を含有、添加及び／又は希釈してなる生物用の飼料が提供される。また、本発明の別の一態様として、前記有効成分を生物に投与することを特徴とする生物の飼育方法が提供される。さらに本発明の別の一態様として、前記有効成分を含有することを特徴とする生物飼育用剤が提供される。

これらの発明において、生物とは例えば養殖動物、ペット動物等であり、養殖動物としては家畜、実験動物、家禽、魚類、甲殻類又は貝類が例示される。飼料としては体調の維持及び／又は改善用飼料が例示される。生物飼育用剤としては浸漬用剤、飼料添加剤、飲料用添加剤が例示される。

これらの発明によれば、それらを適用する前記例示するような生物において、本発明の有効成分が有する生体の恒常性維持作用に基づき、本発明の前記恒常性維持剤と同様の効果が期待できる。

本発明の飼料において、本発明で使用される前記有効成分は通常、対象生物の体重1kg、1日当たり0.01~2000mg投与される。投与は、例えば、当該有効成分を、人工配合飼料の原料中に添加混合して調製した飼料を用いて行う、または人工配合飼料の粉末原料と混合した後、その他の原料とさらに添加混合して調製した飼料を用いて行うことができる。生物用の飼料中の本発明の有効

成分の含有量は特に限定はなく、目的に応じて設定すれば良いが、好ましくは0.001～15重量%の割合が適当である。

人工配合飼料としては、魚粉、カゼイン、イカミールなどの動物性原料、大豆粕、小麦粉、デンプン等の植物性原料、飼料用酵母等の微生物原料、タラ肝油、イカ肝油等の動物性油脂、大豆油、菜種油等の植物性油脂、ビタミン類、ミネラル類、アミノ酸、抗酸化剤等を原料とする人工配合飼料が挙げられる。また魚肉ミンチ等の魚類用飼料が挙げられる。

本発明の飼料の製造方法に特に限定はなく、一般の飼料の製法に準じて製造することができ、製造された飼料中に本発明の有効成分の有効量が含有、添加及び／又は希釈されていればよい。

また、本発明の有効成分をプール、水槽、保持タンク又は飼育領域の水、海水等に直接、添加し、対象生物を浸漬することにより、投与することもできる。この浸漬方法は対象生物の飼料摂取量が低下したときに特に有効である。本発明の有効成分の水又は海水中の濃度は特に限定はなく、目的に応じて使用すれば良いが、好ましくは0.00001～1重量%の割合が適当である。

また、本発明の有効成分を含有する飲料を飼育用飲料として対象生物に摂取させても良い。飲料中の本発明の有効成分の濃度は特に限定はなく、目的に応じて適宜設定すれば良いが、好ましくは0.0001～1重量%の割合が適当である。本発明の有効成分を含んでなる生物飼育用剤、例えば浸漬用剤、飼料添加剤、飲料用添加剤はそれ自体公知の方法で調製すれば良い。該生物飼育用剤における有効成分の含有量は、本発明の所望の効果が得られれば特に限定されるものではない。

本発明の前記飼料等が適用できる生物としては限定はないが、前記養殖動物としては、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラクダ、ラマ等の家畜、マウス、ラット、モルモット、ウサギ等の実験動物、鶏、アヒル、七面鳥、ダチョウ等の家禽、マダイ、イシダイ、ヒラメ、カレイ、ブリ、ハマチ、ヒラマサ、マグロ、シ

マアジ、アユ、サケ・マス類、トラフグ、ウナギ、ドジョウ、ナマズ等の魚類、クルマエビ、ブラックタイガー、タイショウエビ、ガザミ等の甲殻類等、アワビ、サザエ、ホタテ貝、カキ等の貝類が、ペット動物としてはイヌ、ネコ等が挙げられ、陸上・水中動物に広く適用できる。

本発明により提供される、本発明の有効成分を生物に投与する生物の飼育方法は、例えば、前記飼料及び／又は生物用飼育用剤を、それらにより本発明の所望の効果が得られうるように投与対象の生物に対し投与することにより行うことができる。

本発明の飼料を摂取させること、又は本発明の有効成分の含有液に対象生物を浸漬することにより、家畜、実験動物、家禽、魚類、甲殻類、貝類、ペット動物等の体調を良好に維持したり改善させたりすることができる。

本発明の生体の恒常性維持用食品、飲料または飼料としては、有効成分としての生体の恒常性維持作用を有するフコイダン、その分解物及び／又はそれらの塩が含有、添加及び／又は希釈されており、その作用を発現させるための必要量が含有されていれば特にその形状に限定はなく、タブレット状、顆粒状、カプセル状等の経口的に摂取可能な形状物も包含する。なお、本発明の有効成分は、生体の恒常性維持作用と食物繊維機能とを合わせ持つ健康食品素材として、食品、飲料または飼料の製造素材として極めて有用である。

さらに、本発明の一態様として、生体の恒常性維持のための薬剤を製造するための、フコイダン、その分解物及びそれらの塩からなる群より選択される一つ以上の使用を提供する。

本発明の第2の態様は、着色が少なく、苦味やヨード含量が軽減され、フレッシュ感のある、風味が改善されたフコイダン及び海藻類抽出物、当該フコイダン及び／又は海藻類抽出物を含有する食品、飲料、調味料、飼料、化粧料又は医薬、及びそれらの効率的な製造方法を提供するものである。本発明の態様において、食品、飲料、調味料、飼料、化粧料又は医薬に使用されるフコイダン及び海藻

類抽出物は、本発明により提供される、フコイダン又は海藻類抽出物の製造方法により得られるものである。当該フコイダン及び海藻類抽出物は海藻臭の原因となる成分、色素、タンパク質等が低減又は除去されたものであり、それぞれ好適には無臭性もしくは海藻臭の低減されたフコイダン及び海藻類抽出物、又は無色性もしくは海藻由来の緑褐色の低減されたフコイダン及び海藻類抽出物として提供され、原料素材として他の成分と混合して使用する場合に高濃度で使用しても風味などに影響がなく、他の成分の特徴を生かすことができる。また、後述するように、本発明のフコイダン又は海藻類抽出物の製造方法においてプロテアーゼを使用する場合、得られる本発明のフコイダン又は海藻類抽出物はアレルゲンとなり得るタンパク質が顕著に低減あるいは除去されており、アレルギー反応を回避させた食品、飲料、調味料、飼料、化粧料又は医薬の素材としても特に有用である。さらに、本発明のフコイダン及び海藻類抽出物はヨード（ヨウ素）含量が低減されており、ヨードの過剰摂取は体によくないと言われていることから、食品、飲料、調味料、飼料、化粧料又は医薬の素材として有用である。また、当該フコイダンを本発明の第1の態様に記載のフコイダンと同様に分解し、フコイダンの分解物として当該フコイダンと同様に使用することができる。

また、本発明のフコイダン及び海藻類抽出物は不純物が少ないので、再加工や、他の成分との酵素及び／又は化学反応を行う場合にも、その精製工程でタンパク質除去や不純物による副生成物の除去を軽減又は省略できるので、先駆物質としても使用に優れる。例えば、酵素や酸による水解によるオリゴ糖生成並びに化学合成への使用に好適である。さらに、原料素材としての不純物が少ないので、保存中に成分間の化学変化が生じにくく、成分品質の安定化が図れる。

本発明のフコイダン又は海藻類抽出物の色、タンパク質含量及びヨード含量は具体的には後述の実施例7又は14に記載されるようにして測定することができる。色としては波長660nmにおける吸光度が0.001～0.03が好ましく、0.01～0.02がより好ましい。タンパク質含量としては0.01～8

$g/100\text{ g}$ が好ましく、 $0.1\sim7\text{ g}/100\text{ g}$ がより好ましい。ヨード含量としては $0.1\sim5.5\text{ mg\% (w/v)}$ が好ましく、 $0.2\sim5\text{ mg\% (w/v)}$ がより好ましい。

なお、本発明の態様において提供されるフコイダンは、化合物そのものとして、又はフコイダン画分、すなわちフコイダンと他成分を一部含む組成物として提供される。また、フコイダン、海藻類抽出物、およびその原料の量をいう場合、特段の事情がない限り乾燥重量をいう。

さらに、本発明のフコイダン及び海藻類抽出物は、それらについて知られる種々の生理作用を有するものであり、例えば、アポトーシス誘発作用、肝細胞増殖因子産生増強作用、サイトカイン産生調節作用、育毛作用、コレステロール低下作用、血液清澄作用、抗血液凝固作用、抗がん作用、抗エイズウイルス作用、ならびに抗腫瘍作用等を発現しうる。特に当該フコイダン及び海藻類抽出物は、そのコレステロール低下作用、血液清澄作用、抗血液凝固作用、抗がん作用、抗エイズウイルス作用、ならびに抗腫瘍作用に優れる。

従って、このような本発明のフコイダン及び／又は海藻類抽出物を含有してなる、本発明により提供される食品、飲料、調味料、飼料、化粧料又は医薬（以下、本発明の食品等という場合がある）は種々の点でヒトへの適用性に優れたものであり、フコイダン及び／又は海藻類抽出物の各種作用、特にコレステロール低下作用、血液清澄作用、抗血液凝固作用、抗がん作用、抗エイズウイルス作用、ならびに抗腫瘍作用に基づき、例えば、本発明の医薬によれば、上記作用に感受性を示す疾患の症状の改善もしくは緩和効果や、当該疾患の治療もしくは予防効果を期待できる。従って、本発明の医薬としては、好適にはコレステロール低下用医薬、血液清澄用医薬、抗血液凝固用医薬、抗がん用医薬、抗エイズウイルス用医薬、又は抗潰瘍用医薬が提供される。

本発明の食品等には前述の還元抽出フコイダンが使用される。また、本発明により提供される海藻類抽出物から得られるフコイダンを使用することもできる。

一方、本発明の食品等に使用される当該海藻類抽出物は、具体的には以下に示す方法により得られうるものであり、当該海藻類抽出物及びその製造方法は本発明に包含される。

本発明の海藻類抽出物の製造方法は海藻類を還元性物質の存在下で抽出する工程を含むことを1つの大きな特徴とするものである。

原料としての海藻類は、藻類であればどのようなものでもよく、例えばヒバマタ目、アミジグサ目、コンブ目、ケヤリモ目、クロガシラ目、ムチモ目、ウイキョウモ目、カヤモノリ目、ナガマツモ目、イソガワラ目、シオミドロ目等の褐藻類 (*Phaeophyta*)、イギス目、マサゴシバリ目、ウミゾウメン目、スギノリ目、カクレイト目、ダルス目、テングサ目等の紅藻類 (*Rhodophyta*)、ミル目、カサノリ目、アオサ目、イワズタ目等の緑藻類 (*Chlorophyta*) 等が挙げられる。特に褐藻類が好ましく、褐藻類を本発明に使用した場合、機能性成分であるフコイダンを含む海藻類抽出物が得られ、さらに当該海藻類抽出物より還元抽出フコイダンを高純度、高収率で得ることもできる。このうちコンブ目のコンブ科及びチガイソ科が特に好ましい。コンブ科としては、例えばマコンブ、リシリコンブ、ホソメコンブ、ミツイシコンブ、ガゴメコンブなどを用いることができる。また、チガイソ科としては、例えばワカメ、ヒロメ、アオワカメなどを用いることができる。さらに、ワカメは葉状体とメカブ(胞子葉)のいずれか、もしくはいずれをも用いることができる。

本発明の海藻類抽出物の製造方法において、抽出前における原料の前処理の方法は特に限定はないが、単なる水洗、焙炒、焙煎、蒸しを通常の方法に従って行ってもよく、後述のようにプロテアーゼ処理を行ってもよく、又これらを組み合わせてもよい。前処理後の海藻類の形状は特に限定はないが、粉状、フレーク状、細片、角切りまたは薄片、そのまで使用すればよい。

本発明に用いる還元性物質は特に限定はないが、食用に供されるものが好ましく、還元の効果や味に及ぼす影響からアスコルビン酸、アスコルビン酸塩、エリ

ソルビン酸、エリソルビン酸塩、システイン及びグルタチオンからなる群より選ばれる1つ以上を使用することが好適である。ここで、アスコルビン酸塩及びエリソルビン酸塩はナトリウム、カリウム、カルシウム等の塩が好適である。使用する還元性物質の量は特に限定はないが、抽出に用いる溶媒100重量部に対し好ましくは0.005~1.0重量部、より好ましくは0.01~0.1重量部である。

また、生産効率の観点から、海藻類からの海藻類抽出物の抽出は還元性物質存在下で温水又は溶剤を用いて行うのが好ましく、さらに海藻類をあらかじめプロテアーゼ処理した後に還元性物質存在下で温水又は溶剤抽出する、又は、海藻類を還元性物質存在下でプロテアーゼ処理しながら温水又は溶剤抽出するのがより好ましい。なお、温水の温度としては、後述する抽出温度内であるのが好ましい。

抽出方法には特に限定はなく、操作性の観点から、公知の温水浸漬法、温水散水法、または温水循環法が好ましいが、その他、超臨界抽出法により抽出を行うこともできる。

本発明における抽出条件は特に限定するものではなく、例えば、前記抽出方法において公知の条件に準じて抽出を行うことができる。

好適な態様では、原料として使用する海藻類（乾物）の重量は、抽出に用いる溶媒及び当該海藻類乾物の合計100重量部に対し、生産効率の観点から、好ましくは0.5以上2.5重量部未満であり、香味の点から、より好ましくは1~1.0重量部である。尚、0.5~2.5重量部の範囲で抽出後、得られた海藻類抽出物を濃縮して含有物の濃度を上昇させて使用することもでき、又は粉末化してもよい。更に、希釈して用いてもよい。抽出に用いる溶媒は特に限定はなく、無毒であれば可飲のものでもよい。例えば、水又は溶剤が適宜使用できる。溶剤としては有機及び無機のものが使用でき、例えばエチルアルコールやエチルアルコール水溶液等が挙げられる。また、例えば、超臨界抽出を行う場合には炭酸ガス等

が挙げられる。取り扱いの容易性からは水を溶媒として好適に使用できる。抽出に用いる水は特に限定はなく、飲用に供されるものが好ましいが、中でも脱塩水、蒸留水が好ましく、水道水も使用できる。

抽出温度は、抽出効率の観点から、好ましくは30～130°Cであり、より好ましくは75～130°Cであり、特に好ましくは50～100°Cである。また、海藻類抽出物の官能的品質の観点から、さらに80～100°Cが好ましい。抽出時間は、生産効率の観点から、好ましくは5分間～32時間、より好ましくは0.2～24時間、さらに好ましくは0.5～5時間である。このときの抽出液のpHは3～7が好適である。また、抽出後のpHは3～6前後が保存と香味保持の上から好ましい。海藻類からの抽出物を含む抽出液と抽出残渣との固液分離の方法は特に限定しないが、通常の濾別、遠心分離、または籠状の金網中に原料を入れ、抽出後、抽出残渣を回収することもできる。固液分離後の精製は、抽出液に可溶化している高分子成分を低温下（好ましくは10°C以下0°C以上）で冷却し、これらの成分を常法の柿渋及び滓下げ剤を用いて凝集、沈澱させ、濾過することにより、清澄な液を得ることができる。濾過は好ましくは1μmφ又は0.45μmφポアサイズメンブレンフィルターを用いて濾過すると良い。

プロテアーゼ処理、すなわち、原料である海藻類のプロテアーゼによる分解を行う場合に用いるプロテアーゼは特に限定はなく、動物、植物及び微生物起源のものが使用でき、例えば、動物起源のものとして、キモトリプシン、トリプシン、ペプシン及びキモシンが挙げられ、植物起源のものとして、パパイン及びプロメラインが挙げられ、微生物起源のものとして、細菌、放線菌、麴菌、カビ及び担子菌由来の酸性、中性及びアルカリ性プロテアーゼが挙げられる。また、コラゲナーゼ、エステラーゼ及びケラチナーゼもここでいうプロテアーゼに包含される。また、カルボキシペプチダーゼ、アミノペプチダーゼ、リパーゼ、ペクチナーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼの少なくとも一つ以上とプロテアーゼを併用してもよい。

海藻類を前処理としてプロテアーゼ処理する場合、プロテアーゼの使用量は特に限定はないが、使用海藻類乾物 100 重量部あたり、好ましくは 0.01～1.0 重量部、より好ましくは 0.05～5 重量部である。溶媒は、所望の酵素反応を行いうるものであれば特に限定はないが、水又はエチルアルコール水溶液（エチルアルコール濃度、0～50 容量%）が好適に使用できる。また、反応温度は、使用酵素によって特に限定はなく、好ましくは 30～120 °C であるが、作業上 50～100 °C がより好ましい。反応時間は、反応温度によって適宜設定できるが、好ましくは 0.1～32 時間、より好ましくは 0.2～24 時間である。

一方、抽出過程においてプロテアーゼを添加し、プロテアーゼ処理をしながら抽出を行う場合、プロテアーゼの使用量は特に限定はないが、使用海藻類乾物 100 重量部あたり、好ましくは 0.01～1.0 重量部、より好ましくは 0.05～5 重量部である。

得られた海藻類抽出物は、例えば、120 °C、20 秒間殺菌加熱後、濃縮、そのまま又は水で希釈してさらに無菌濾過して容器へ充填する。この時窒素ガス充填を行ってもよく、その後 90 °C、1 分間加熱殺菌して製品とすることができます。

本発明の抽出物の形状としては、特に限定はないが、液状、乾燥物等の固形状、粉末状でも良い。

さらに本発明の海藻類抽出物から公知の方法で還元抽出フコイダンを高収率に分離することができる。海藻類抽出物からの当該フコイダンの分離方法は、特に限定はなく、公知の高分子成分の分離方法であればよい。例えば、海藻類を還元性物質存在下でプロテアーゼ処理後、熱水又は溶剤抽出し、フィルタープレスで固液分離する。液部を限外フィルターで濃縮・脱塩後、ケイソウ土により濾過する。次いで、濾過液を濃縮機で濃縮し、殺菌をオートクレーブを用いて 121 °C、15 分間で行う。この濃縮液を凍結乾燥して本発明の還元抽出フコイダンを得ることができる。

さらに、得られたフコイダンを公知の方法により分解し、当該フコイダンの分解物を得ることができる。例えば、国際公開第97/26896号パンフレット、国際公開第99/41288号パンフレット、国際公開第00/50464号パンフレット記載の方法によりフコイダンの分解物を調製し、本発明の海藻類抽出物又はフコイダンと同様に使用することができる。これらのフコイダン分解物も本発明に包含される。

本発明の第2の態様において提供される食品、飲料、調味料、飼料、ならびに医薬の製造方法及びその使用態様は特に限定されるものではなく、それぞれ、例えば前記本発明の第1の態様において記載した食品、飲料、飼料、ならびに恒常性維持剤に準じればよい。一方、同様に提供される化粧料は、有効成分として含有するフコイダン及び／又は海藻類抽出物の公知の生理作用、例えば、皮膚の保湿性や弾力性の向上作用、皮膚の老化防止作用、抗アレルギー作用等を有しており、当該化粧料によれば、しわの改善・予防、皮膚の弾力性向上・維持、皮膚肥厚改善・予防等の効果が期待できる。その製造方法及び使用態様は特に限定するものではないが、例えば、以下の態様を挙げることができる。

当該化粧料における、本発明のフコイダン及び／又は海藻類抽出物の含有量は、通常、好ましくは0.0001～20重量%、より好ましくは0.001～5重量%、更に好ましくは0.03～3重量%である。

また、その他の成分として、化粧料分野において公知の各種成分を所望により含有せしめることができる。かかる成分としては、例えば、ピロリドンカルボン酸塩等の保湿剤、流動パラフィン、ワセリン等の皮膚柔軟剤、ビタミンE等のビタミン類、プロピレングリコールモノステアレート等の界面活性剤、ステアリルアルコール等の乳化安定剤、防腐剤、顔料、抗酸化剤、紫外線吸収剤等を挙げることができる。これらの成分は、本発明の所望の効果の発現を阻害しない範囲で、所望により当該成分の効果が期待されうる量で含有させればよい。

本発明の化粧料の形状としては、特に限定するものではなく、たとえば、ロー

ション類、乳液類、クリーム類、パック類、浴用剤、洗顔剤、浴用石ケン、浴用洗剤又は軟膏が好適である。

当該化粧料は、本発明のフコイダン及び／又は海藻類抽出物ならびに所望により前記その他の成分を原料として用い、化粧品分野における公知の方法に従って適宜製造することができる。また、化粧料の形状に応じ、適宜、所望の効果が得られるように使用すればよい。例えば、ローション類であれば、例えば、ヒトの顔面全体に適用するような場合、1回の使用当たり前記有効成分の量として、好ましくは0.01～5g程度用いれば、肌に張りや艶を与える、美肌効果が得られる。

さらに、本発明は、本発明の食品等の好適な製造方法を提供する。すなわち、本発明のフコイダンの製造方法における、海藻類を還元性物質の存在下で抽出する工程及び／又は本発明の海藻類抽出物の製造方法における、海藻類を還元性物質の存在下で抽出する工程を包含することを特徴とする、食品、飲料、調味料又は飼料の製造方法、化粧料の製造方法、ならびに医薬（好適には、コレステロール低下用医薬、血液清澄用医薬、抗血液凝固用医薬、抗がん用医薬、抗エイズウイルス用医薬、又は抗潰瘍用医薬）の製造方法を提供する。かかる方法は、食品、化粧料、医薬品等の公知の製造工程におけるいずれかの段階において、本発明のフコイダン及び／又は海藻類抽出物の製造工程を含むものである。前記食品等の原料であって、有効成分として働くフコイダン及び／又は海藻類抽出物の製造から最終の製品形態である食品等の製造を連続的に行うことで、本発明の食品等のより効率的な製造が可能となる。

なお、本発明に使用する、特に生体の恒常性維持作用を有するフコイダン、その分解物及び／又はそれらの塩、ならびに海藻類抽出物はラットへの経口投与において2g／kgを経口単回投与しても死亡例は認められない。

以下、実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらの

記載に何ら限定されるものではない。なお、特段の事情がない限り実施例における%は重量%を意味する。

製造例 1

(1) ガゴメコンブを充分乾燥後、乾燥物 20 kg を自由粉碎機（奈良機械製作所製）により粉碎した。

水道水 900 リットルに塩化カルシウム二水和物（日本曹達社製） 7.3 kg を溶解し、次にガゴメコンブ粉碎物 20 kg を混合した。液温 12 °C から液温 90 °C となるまで水蒸気吹込みにより 40 分間昇温させ、次いで攪拌下 90 ~ 95 °C に 1 時間保温し、次いで冷却し、冷却物 1100 リットルを得た。

次いで固液分離装置（ウエストファリアセパレーター社製 CNA 型）を用い、冷却物の固液分離を行い、約 900 リットルの固液分離上清液を調製した。

固液分離上清液 360 リットルをダイセル社製 F E 10 - F C - F U S 03 82 (分画分子量 3 万) を用い、20 リットルまで濃縮した。次いで水道水を 20 リットル加え、また 20 リットルまで濃縮するという操作を 5 回行い、脱塩処理を行い、ガゴメコンブ由来の抽出液 25 リットルを調製した。

該溶液 1 リットルを凍結乾燥し、ガゴメコンブ由来フコイダン乾燥物 13 g を得た。

(2) 製造例 1 - (1) 記載のフコイダン乾燥物 7 g を、50 mM 塩化ナトリウムおよび 10 % エタノールを含む 20 mM イミダゾール緩衝液 (pH 8.0) 700 ml に溶解し、遠心分離により不溶物を除去した。D E A E - セルロファイン A - 800 カラム (ϕ 11.4 cm × 48 cm) を同緩衝液にて平衡化し、遠心分離上清をアプライ後、同緩衝液で洗い、塩化ナトリウムの 50 mM から 1.95 M の濃度勾配により溶出させた (1 フラクション : 250 ml) 。フェノール硫酸法及びカルバゾール硫酸法にて、総糖量及びウロン酸含量を求め、溶出順にフラクション 43 ~ 49、フラクション 50 ~ 55、フラクション

56～67の画分を得た。次に、これらの画分を電気透析により脱塩後、凍結乾燥し、フラクション43～49よりI画分(340mg)、フラクション50～55よりII画分(870mg)、フラクション56～67よりIII画分(2.64g)をそれぞれ調製した。

第1図にガゴメコンブ由来フコイダンのDEAE-セルロファインA-800カラム溶出パターンを示す。第1図において縦軸はカルバゾール硫酸法での530nmの吸光度(図中黒丸)、フェノール硫酸法での480nmの吸光度(図中白丸)、及び電導度(mS/cm:図中白四角)、横軸はフラクション番号を示す。図中前ピークがU-フコイダン、後ピークがF-フコイダンである。

(3) ガゴメコンブから硫酸化フコース含有多糖画分を調製した。すなわち、市販の乾燥ガゴメコンブ 2kgを穴径1mmのスクリーンを装着させたカッターミル(増幸産業社製)で破碎し、20リットルの80%エタノール中に懸濁後、25°Cで3時間攪拌し、ろ紙でろ過した。得られた残渣を40リットルの100mM 塩化ナトリウムを含む30mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)に懸濁し、95°Cで2時間処理後、穴径106μmのステンレス製ふるいでろ過した。得られたろ液に200gの活性炭、4.5リットルのエタノール、12,000Uのアルギン酸リアーゼK(ナガセ生化学工業社製)を添加し、25°Cで20時間攪拌後、遠心分離した。得られた上清を排除分子量10万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機で4リットルに濃縮後、遠心分離により不溶物を除去し、5°Cで24時間放置した。生じた沈殿を遠心分離により除去し、得られた上清を限外ろ過機により溶媒交換して100mM 塩化ナトリウム溶液とした。この溶液を4°C以下に冷却後、塩酸によりpHを2.0とし、生じた沈殿を遠心分離により除去した。得られた上清のpHを水酸化ナトリウムにより8.0とし、4リットルに濃縮後、限外ろ過機により20mM 塩化ナトリウムに溶媒交換した。この溶液中の不溶物を遠心分離により除去後、凍結乾燥し、ガゴメコンブ由来フコイダンの乾燥物76gを得た。

製造例 2

(1) アルテロモナス s.p. SN-1009 (FERM BP-5747) を、グルコース 0.25%、ペプトン 1.0%、酵母エキス 0.05%を含む人工海水（ジャマリンラボラトリー社製）pH 8.2 からなる培地 600 ml を分注して殺菌した（120°C、20 分間）2 リットルの三角フラスコに接種し、25°Cで 26 時間培養して種培養液とした。ペプトン 1.0%、酵母エキス 0.02%、下記製造例 2-(2) に記載のフコイダン 0.2%、及び消泡剤（信越化学工業社製 KM70）0.01%を含む人工海水（pH 8.0）からなる培地 20 リットルを 30 リットル容のジャーファメンターに入れ て 120°C、20 分間殺菌した。冷却後、上記の種培養液 600 ml を接種し、24°Cで 24 時間、毎分 10 リットルの通気量と毎分 250 回転の攪拌速度の条件で培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体及び培養上清を得た。得られた培養上清を、排除分子量 1 万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により濃縮後、85% 飽和硫酸安塩析し、生じた沈殿を遠心分離により集め、10 分の 1 濃度の人工海水を含む 20 mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.2）に対して充分透析し、硫酸化多糖に選択的に作用するエンド型硫酸化多糖分解酵素（F-フコイダン特異的分解酵素）液 600 ml を調製した。

(2) 乾燥したガゴメコンブ 2 kg を直径 1 mm のスクリーンを装着させたカッターミル（増幸産業社製）により粉碎し、得られたコンブのチップを 20 リットルの 80% エタノール中に懸濁し、25°Cで 3 時間攪拌し、ろ紙でろ過後、残渣を充分洗浄した。得られた残渣を、95°Cに加温した 40 リットルの 50 mM の塩化ナトリウムを含む 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.5 に懸濁し、時々攪拌しながら 95°Cで 2 時間維持し、硫酸化多糖を抽出した。

抽出液中の懸濁物を、ろ過し、ろ液を調製した後、ろ過残渣を 3.5 リットルの 100 mM 塩化ナトリウムにより洗浄し、更にろ液を得た。

両ろ液を合わせた後、30°Cまで温度下げ、3000Uのアルギン酸リーゼ（ナガセ生化学工業社製）を添加後、エタノールを4リットル加え25°Cで24時間攪拌した。次に遠心分離を行い、得られた上清を排除分子量10万のホロファイバーを備えた限外ろ過機により4リットルに濃縮し、更に、10%のエタノールを含む100mMの塩化ナトリウムにより、着色性物質がろ過されなくなるまで限外ろ過を続けた。

非ろ過液中に生じた沈殿は遠心分離により除去し、この上清を5°Cまで温度下げ、0.5N 塩酸によりpHを2.0とした後、生じたタンパク質等の沈殿を遠心分離により除去し、得られた上清を速やかに1N 水酸化ナトリウムによりpHを8.0とした。

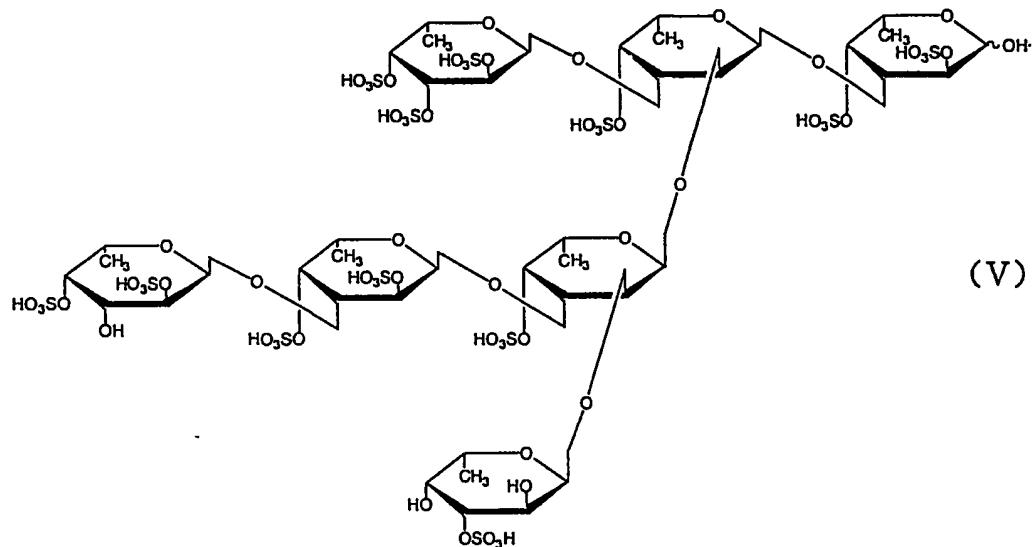
次に、排除分子量10万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により限外ろ過を行い、20mM 塩化ナトリウム（pH 8.0）により完全に溶媒置換後、再度pHを8.0として遠心分離後、凍結乾燥を行い、約95gの硫酸化多糖を調製した。

(3) 乾燥したガゴメコンブ 2kg を直径1mmのスクリーンを装着させたカッターミルにより粉碎し、得られたコンブのチップを20リットルの80%エタノール中に懸濁し、25°Cで3時間攪拌し、ろ紙でろ過後、残渣を充分洗浄した。得られた残渣を、30mlの上記製造例2-(1)で調製したF-フコイダン特異的分解酵素液、10%のエタノール、100mM 塩化ナトリウム、50mM 塩化カルシウムを含む20リットルの50mM イミダゾール緩衝液(pH 8.2)に懸濁し、25°Cで48時間攪拌した。この懸濁液を網目の直径32μmのステンレス金網でろ過し、残渣を50mM 塩化カルシウムを含む10%のエタノールで洗浄した。更にその残渣を10リットルの50mM 塩化カルシウムを含む10%のエタノール中に懸濁し、3時間攪拌後、ステンレス金網でろ過し、同様に洗浄した。更にその残渣を同条件で懸濁後、16時間攪拌し、直径32μmのステンレス金網でろ過し、同様に洗浄した。

こうして得られたろ液及び洗浄液を集め、排除分子量3000のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により限外ろ過し、ろ過液と非ろ過液に分離した。このろ過液をロータリーエバポレーターで約3リットルに濃縮後、遠心分離して上清を得た。得られた上清を排除分子量300の膜を装着させた電気透析器により脱塩し、この溶液に0.1Mとなるように酢酸カルシウムを添加し、生じた沈殿を遠心分離により除去した。この上清をあらかじめ50mM 酢酸カルシウムにより平衡化させたDEAE-セルロファインカラム（樹脂量4リットル）にかけ、50mM 酢酸カルシウム及び50mM 塩化ナトリウムで充分洗浄後、50mM～800mMの塩化ナトリウムのグラジェントにより溶出させた。この時の分取量は1本当り500mlで行った。分取した画分をセルロースアセテート膜電気泳動法〔アナリティカル バイオケミストリー（Analytical Biochemistry）、第37巻、第197～202頁（1970）〕により分析したところ塩化ナトリウム濃度が約0.4Mで溶出される硫酸化糖（フラクションナンバー63付近）が均一であった。そこで、まずフラクションナンバー63の液を150mlに濃縮後、濃度が4Mとなるように塩化ナトリウムを添加し、あらかじめ4M 塩化ナトリウムにより平衡化したフェニルセルロファインカラム（樹脂量200ml）にかけ、4M 塩化ナトリウムにより充分洗浄した。非吸着性の硫酸化糖画分を集め、排除分子量300の膜を装着させた電気透析器により脱塩し、脱塩液 505mlを得た。得られた脱塩液のうち40mlを、10%のエタノールを含む0.2M 塩化ナトリウムによって平衡化したセルロファインGCL-90のカラム（4.1cm×87cm）にかけて、ゲルろ過を行った。分取は1フラクション当たり9.2mlで行った。全フラクションに対して総糖量の分析をフェノール硫酸法〔アナリティカル ケミストリー（Analytical Chemistry）、第28巻、第350頁（1956）〕により行った。

この結果、硫酸化糖は1つのピークを形成したので、そのピークの中央部分、フラクションナンバー63～70を集め、排除分子量300の膜を装着させた電

気透析器により脱塩後、凍結乾燥し、112mgの下記式(V)で表される化合物の乾燥品を得た。該化合物を7-12SFd-Fと称す。



(4) 十分に乾燥させたガゴメコンブを自由粉碎機（奈良機械製作所製）により粉碎した。粉碎したガゴメコンブを95℃、2時間熱水抽出後、デカンターにて固液分離し、次いで排除限界分子量3万の限外濾過膜により濃縮し、フコイダン抽出液を得た。

(5) 國際公開第99/11797号パンフレット記載のエンド型硫酸化多糖分解酵素(F-フコイダン特異的分解酵素)を含有する大腸菌BL21(DE3)/pEFDAI103の培養液を、分画分子量1万の限外ろ過膜にて濃縮し、得られた濃縮液をF-フコイダン特異的分解酵素液とした。50mM 塩化カルシウムおよび300mM 塩化ナトリウムを含む25mM ホウ酸／水酸化ナトリウム緩衝液(pH7.5)に、製造例2-(4)記載のフコイダン抽出液、およびF-フコイダン特異的分解酵素液を加え、37℃で19時間反応させた。

反応液を排除限界分子量1万の限外濾過膜により濃縮し、次いで濾液を逆浸透濃縮装置(東レ製)によりさらに濃縮した。得られた濃縮液を電気透析器(旭化

成製)にて脱塩した。

得られた脱塩液をDE 52(ワットマン製)、DEAE-セファロースカラム(アマシャム ファルマシア バイオテク製)、ポリエチレンイミングルカラム(山善製)に负荷し、順次クロマトグラフィーを行った。

得られた硫酸化糖画分を電気透析器にて脱塩し、次いで滅菌濾過、凍結乾燥を行い、上記の式(V)で表される化合物 7-12SFd-F乾燥標品を得た。

(6) 製造例1-(2)記載の方法で調製したF-フコイダン 9.8mgを5m1のDMSOに溶解し、室温にてピペリシン硫酸 9.80mgを添加した後、80°Cにて2時間攪拌した。反応液を冷却後、分子量1000カットの透析膜にて2日間透析した。得られた透析内液を陽イオン交換カラム【アンバーライトIRA-120(Na⁺)】に供じた後、減圧乾固することによりF-フコイダンの高硫酸化体 9.8mgを調製した。

(7) 製造例2-(3)記載の方法で調製した7-12SFd-F 3.4mgを4m1のDMSOに溶解し、その後、製造例2-(6)と同様の操作で、7-12SFd-Fの高硫酸化体 3.4mgを調製した。

製造例3

(1) 乾燥ガゴメコンプ 2kgを穴径1mmのスクリーンを装着したカッターミル(増幸産業社製)により破碎し、20リットルの80%エタノール中で25°C、3時間攪拌後ろ過、洗浄した。得られた残渣を50mM 塩化カルシウム、100mM 塩化ナトリウム、10%エタノール、及び1Uの製造例2-(1)で調製したアルテロモナス s.p. SN-1009由来F-フコイダン特異的分解酵素を含む20リットルの30mM イミダゾール緩衝液(pH 8.2)に懸濁し、25°Cで2日間攪拌し、次いで穴径32μmのステンレス金網でろ過し、洗浄した。得られた残渣を100mM 塩化ナトリウム、10%エタノール、及び4gのアルギン酸リーゼ(ナガセ生化学工業製)を含む40リットルの

リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.6）に懸濁し、25°Cで4日間攪拌後、遠心分離し上清を得た。得られた上清中に含まれるアルギン酸の低分子化物を除去するため排除分子量10万のホロファイバーを装着した限外ろ過機により2リットルに濃縮後、10%エタノールを含む100mM 塩化ナトリウムで溶媒交換した。この溶液に等量の400mM 酢酸カルシウムを添加攪拌後、遠心分離し、得られた上清を氷冷しながら、1N 塩酸でpH 2.0とした。生じた沈殿を遠心分離により除去し、得られた上清を1N 水酸化ナトリウムによりpH 8.0とした。この溶液を限外ろ過により1リットルに濃縮後、100mM 塩化ナトリウムで溶媒交換した。この時生じた沈殿は遠心分離により除去した。得られた上清中の疎水性物質を除去するため、上清に1Mとなるように塩化ナトリウムを加えて、1M 塩化ナトリウムで平衡化した3リットルのフェニルセルロファインカラム（生化学工業製）にかけ、素通り画分を集めた。この画分を限外ろ過機により濃縮後、20mM 塩化ナトリウムで溶媒交換し、凍結乾燥した。凍結乾燥物の重量は29.3gであった。

(2) 上記の凍結乾燥物 15gを400mM 塩化ナトリウム及び国際公開第97/26896号パンフレット記載のフラボバクテリウム s.p. SA-0082 (FERM BP-5402) を培養し、該培養物から得られたエンド型硫酸化多糖分解酵素 (U-フコイダン特異的分解酵素) を9U含む1.5リットルの50mM トリス-塩酸緩衝液に溶解し、25°Cで6日間反応後、エバポレーターで約300mlに濃縮した。濃縮液を排除分子量3500の透析チューブに入れて徹底的に透析し、透析チューブ内に残った液を、50mM 塩化ナトリウムで平衡化した4リットルのDEAE-セルロファインA-800カラムにかけ、50mM 塩化ナトリウムで充分洗浄後、50~650mMの塩化ナトリウムの濃度勾配により溶出を行った。更に同カラムを650mM 塩化ナトリウムで充分溶出させた。溶出画分のうち650mM 塩化ナトリウムで溶出した画分を硫酸化フコガラクタン画分として集め、排除分子量10万の限外ろ過機によ

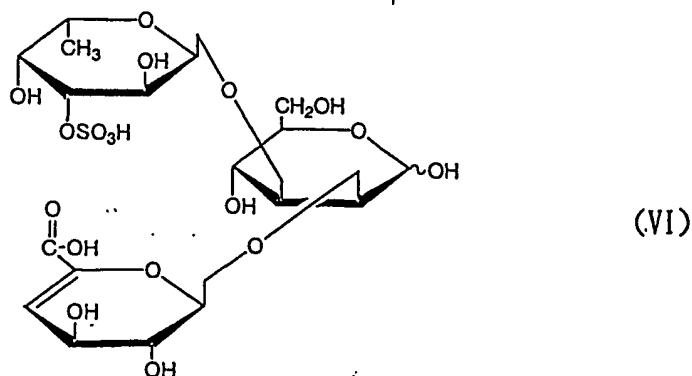
り濃縮後、10 mM 塩化ナトリウムで溶媒を置換し、凍結乾燥して硫酸化フコガラクタンの凍結乾燥物を0.85 g 得た。得られた硫酸化フコガラクタン（G-フコイダン）は、構成糖としてガラクトースとフコースを含有し、そのモル比は、約2:1であった。

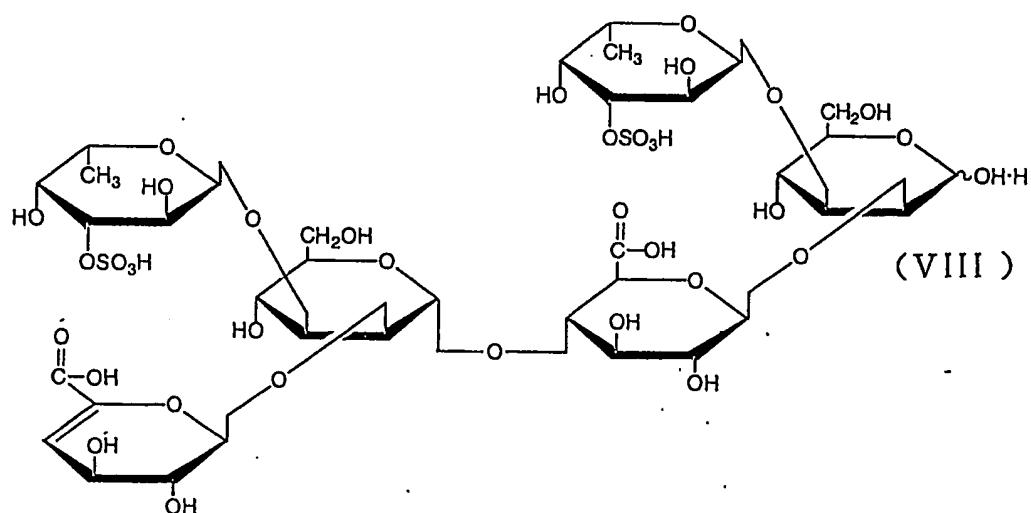
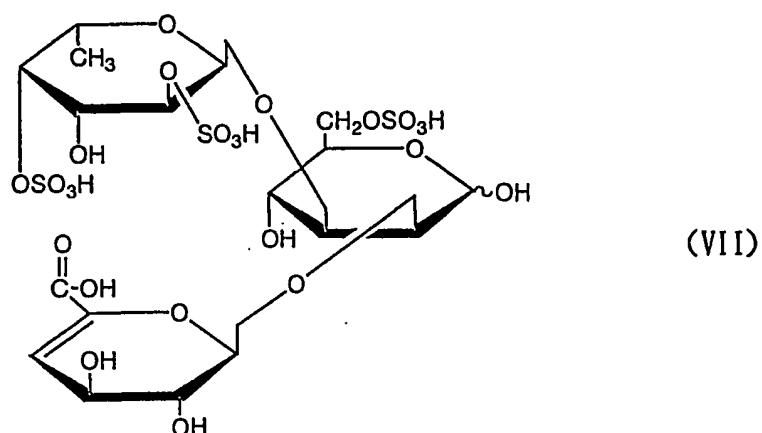
製造例4

製造例1-(3)で得られたガゴメコンブ由来のフコイダンに製造例3-(2)記載のU-フコイダン特異的分解酵素を作用させ分解物の調製を行った。

すなわち、2.5%のフコイダン水溶液 16 mlと、50 mM リン酸緩衝液(pH 7.5) 12 mlと4M 塩化ナトリウム 4 mlと32 mU/ml の前記U-フコイダン特異的分解酵素の水溶液 8 mlを混合し、25°Cで48時間反応させた。

反応液をセルロファインGCL-300(生化学工業社製)のカラムにより分子量分画し、分子量2000以下の画分を集めた。この画分をマイクロアシライザーグ3(旭化成社製)により脱塩後、DEAE-セファロースFFのカラムにより3つの画分に分離し、脱塩後、凍結乾燥し、それぞれ41 mg、69 mg、及び9.6 mgの精製物を得た。質量分析により、これらはそれぞれ分子量が564、724、1128でありNMR分析により下記式(VI)、(VII)、(VII I)で表される化合物であることを確認した。これらをそれぞれ3-1S、3-3S、6-2SFd-Uと称す。





製造例 5

市販のワカメ メカブの乾燥物 1 kg を穴の径が 1 mm のスクリーンを装着させたカッターミルにより破碎後、10 リットルの 80 % エタノール中に懸濁し、3 時間攪拌後、ろ紙によりろ過し、残渣を得た。残渣を 50 mM 塩化ナトリウムを含む 40 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 20 リットルに懸濁し、9

5 °Cで2時間処理した。処理液を37 °Cまで冷却後、10%となるようにエタノールを添加し、市販のアルギン酸リーゼK（ナガセ生化学工業社製）を12000U添加後、室温で24時間攪拌した。得られた処理液を遠心分離し、その上清を排除分子量10万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により2リットルに濃縮後、生じた沈殿を遠心分離により除去した。得られた上清を5 °Cに冷却後、0.5N 塩酸を添加してpHを2.0とした後、30分間攪拌し、生じた沈殿を遠心分離により除去した。上清のpHを0.5N 水酸化ナトリウムにより8.0とし、限外ろ過により溶媒を20mM 塩化ナトリウムに置換した。溶液のpHを8.0に調整後、遠心分離して得られた上清を凍結乾燥し、90.5gのワカメ メカブ由来フコイダンを得た。

製造例 6

製造例1－(1)記載の方法で調製したガゴメコンブ由来フコイダン 2gを100mlの水に溶解し、そのpHをクエン酸にてpH3に調整後、100°Cで3時間処理し、当該フコイダンの酸分解物を調製した。この酸分解物をセルロファインGCL-300、又はセルロファインGCL-25によるゲルろ過で分子量分画し、分子量25000超(A画分)、25000~10000超(B画分)、10000~5000超(C画分)、5000~2000超(D画分)、2000~500超(E画分)、500以下(F画分)に分画した。更にこれらの画分及び酸分解物をそれぞれ脱塩後、凍結乾燥を行い、酸分解物の各分画物及び酸分解物を調製した。

製造例 7

市販の塩蔵モズク 5kgを20リットルのエタノールと混合し、はさみで細断した。1晩放置後、ろ紙でろ過し、得られた残渣を12.5リットルの水に懸濁し、95 °Cで2時間維持した。懸濁液をろ紙によりろ過後、350mM 塩化

ナトリウムを含む 2. 5 % 塩化セチルピリジニウム溶液を 2 6 0 0 m l 添加し、3 日間放置した。上清部分を廃棄し、沈殿部分を遠心分離して、その上清も廃棄した。得られた沈殿に 2. 5 リットルの 3 5 0 mM 塩化ナトリウムを添加後ホモジナイザーで均一にし遠心分離した。この洗浄操作を 3 回繰り返した。得られた沈殿に 4 0 0 m l の 4 0 0 mM 塩化ナトリウムを添加後、ホモジナイザーで均一にし、8 0 % となるようにエタノールを添加して 3 0 分間攪拌後、ろ紙でろ過した。得られた残渣に 5 0 0 m l の塩化ナトリウム飽和 8 0 % エタノールを添加後、ホモジナイザーで均一にし、1 リットルとなるように塩化ナトリウム飽和エタノールを添加して 3 0 分間攪拌後ろ紙でろ過した。この洗浄操作をろ液の 2 6 0 n m の吸光度が実質的に 0 になるまで繰り返した（通常 5 回）。得られた残渣を 1. 5 リットルの 2 M 塩化ナトリウムに溶解後、不溶物を遠心分離により除去し、あらかじめ 2 M 塩化ナトリウムにより平衡化した 1 0 0 m l の D E A E セルロファイン A - 8 0 0 のカラムを素通しさせた。素通り画分を排除分子量 1 0 万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により 2 リットルに濃縮後、限外ろ過により溶媒を 2 mM 塩化ナトリウムに置換した。この溶液を遠心分離して得られた上清を凍結乾燥し、2 2. 9 g のモズク由来フコイダンを得た。

製造例 8

マナマコ 5 k g を解体し、内臓を除去し、体壁を集めた。体壁湿重量 2 0 0 g 当り 5 0 0 m l のアセトンを加え、ホモジナイザーで処理後ろ過し、残渣をこれ以上着色物質がでなくなるまでアセトンで洗浄した。この残渣を吸引乾燥し、1 4 0 g の乾燥物を得た。この乾燥物に 2. 8 リットルの 0. 4 M 食塩水を加え、1 0 0 °C で 1 時間維持後、ろ過し、残渣を 0. 4 M 食塩水で充分洗浄し、抽出液 3. 7 リットルを得た。この抽出液に 5 % セチルピリジニウムクロリドをこれ以上沈殿が生じなくなるまで加え、生じた沈殿を遠心分離で集めた。この沈殿を 0. 4 M 食塩水に懸濁後、再度遠心分離し、得られた沈殿に 1 リットル

の 4 M 食塩水を添加し、ホモジナイザーで処理後、攪拌しながら 4 リットルのエタノールを添加し、1 時間攪拌後、ろ過し、沈殿を得た。この沈殿に対して、80%エタノールに懸濁後ろ過という工程を上清の 260 nm の吸光度が実質的に 0 になるまで繰り返した。得られた沈殿を 2 リットルの 2 M 食塩水に懸濁し、不溶物を遠心分離により除去した。上清を排除分子量 3 万の膜を備えた限外ろ過装置により限外ろ過し、完全に脱塩後、凍結乾燥し、3.7 g のナマコ由来フコイダンを得た。

製造例 9

市販の塩蔵オキナワモズク 625 g を 4375 ml の 30 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に懸濁し、ホモジナイザーにより 8000 回転／分で 5 分間処理後、95 °C で 1 時間維持し、遠心分離により上清を得た。得られた上清に 10 g の活性炭を添加後 30 分間攪拌し、遠心分離により上清を得た。得られた上清を排除分子量 10 万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により 2 リットルに濃縮後、20 mM 塩化ナトリウムで溶媒置換し、凍結乾燥して 10.9 g のオキナワモズク由来のフコイダン画分の乾燥物を得た。

製造例 10

粉碎したヒバマタ (*Fucus vesiculosus*) の乾燥物 1 kg を、10 リットルの 80%エタノール中に懸濁し、3 時間攪拌後、ろ紙によりろ過し、残渣を得た。残渣を 100 mM 塩化ナトリウムを含む 30 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) 30 リットルに懸濁し、95 °C で 2 時間維持した。懸濁液を 37 °C まで冷却後、100 g の活性炭を添加し、30 分間攪拌した。市販のアルギン酸リーゼ K を 3000 U 添加後、10%となるようにエタノールを添加し、室温で 24 時間攪拌した。得られた反応液を遠心分離し、その上清を排除分子量 10 万のホロファイバーを装着させた限外ろ過機により 2 リットルに濃縮後、生じた沈殿を

遠心分離により除去した。この上清に 100 mM 塩化ナトリウムを含む 30 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) を加えながら限外ろ過し、色素を除去した。得られた非ろ過液を 5 °C に冷却後、0.5 N 塩酸を添加して pH を 2.0 とした後 30 分間攪拌し、生じた沈殿を遠心分離により除去した。上清の pH を 0.5 N 水酸化ナトリウムにより 8.0 とし、限外ろ過により溶媒を 20 mM 塩化ナトリウムに置換した。得られた溶液の pH を 8.0 に調整後、遠心分離して得られた上清を凍結乾燥し、71 g のヒバマタ由来フコイダンを得た。

実施例 1 フコイダンの肝線維化抑制効果

7 週齢の雄性 SD 系ラットに豚血清（ギブコ社）を週 2 回、0.5 ml / ラットの用量で 10 週間腹腔内投与することにより肝線維モデルを作製した。製造例 1 - (1) 記載のガゴメコンブ由来フコイダンの溶液は水道水にて 0.5 % に調整し、実験開始 5 週後より、飲水として与えた。コントロール群には水道水を与えた。正常対照群には、豚血清のかわりに生理的食塩水を同様に投与した。

肝線維化の評価は、コラーゲンの主要な構成アミノ酸であるハイドロキシプロリン量の増加を指標として行った。すなわち、摘出した肝組織のハイドロキシプロリン量を測定し、肝組織中ハイドロキシプロリン量を肝重量 1 g 当りの濃度 ($\mu\text{g/g}$ 肝) および肝臓全体のハイドロキシプロリン量 (mg/肝全体) で示した。その結果、コントロール群と比較してガゴメコンブ由来フコイダン投与群では肝組織中のハイドロキシプロリン量は有意に減少していた。さらに、コントロール群におけるコラーゲンの蓄積による肝重量の増加および肝/体重比の上昇についても、ガゴメコンブ由来フコイダン投与群では有意に抑制した。これらの結果を表 1 および表 2 に示す。また、摘出した肝組織を観察したところ、コントロール群では線維化により肝表面の光沢が失われ、凹凸が明瞭であるのに対し、フコイダン投与群では正常対照群と同様に線維化は見られなかった。

表 1

	n	ハイドロキシプロリン量*	
		μg/g肝	mg/肝全体
コントロール群	10	702 ± 94	11.7 ± 1.8
フコイゲン投与群	10	336 ± 31 **	4.9 ± 0.5**
正常対照群	4	164 ± 9	2.2 ± 0.0

* : 平均値±標準誤差

** : p < 0.01 vs コントロール群

表 2

	n	体重(g)	肝重量(g)	肝/体重比(%)
コントロール群	10	463 ± 9	16.5 ± 0.7	3.5 ± 0.1
フコイゲン投与群	10	461 ± 11	14.6 ± 0.4 *	3.2 ± 0.1 **
正常対照群	4	458 ± 14	13.2 ± 0.6	2.9 ± 0.1

平均値±標準誤差

* : p < 0.05 vs コントロール群

** : p < 0.01 vs コントロール群

実施例 2 7-12SFd-Fの肝線維化抑制効果

7週齢の雄性SD系ラットに豚血清（ギブコ社）を週2回、0.5ml/ラットの用量で、8週間腹腔内投与することにより線維肝モデルを作製した。製造例2-(4)で調製した7-12SFd-F乾燥標品を蒸留水で希釈し、100または30mg/5ml/kgの用量で実験開始4週後より、連日強制経口投与した。コントロール群には蒸留水を同様に投与した。正常対照群には、豚血清の代りに生理的食塩水を同様に投与した。

肝線維化の評価は、摘出した肝臓のハイドロキシプロリン量を測定することにより行った。これらの結果を表3に示す。

その結果、豚血清の8週間投与により、肝線維化（肝臓へのコラーゲンの蓄積

) が進行し、肝組織中ハイドロキシプロリン量および単位肝重量当りの濃度は、正常肝の約4倍にまで上昇した。一方、7-12SF d-Fを豚血清投与の4週目より100または30mg/kgの用量で連日経口投与することにより、肝組織中のハイドロキシプロリン量および単位肝重量当りのハイドロキシプロリンの濃度は、ほぼ4週目の時点の値に維持された。

以上の結果より、7-12SF d-Fが肝線維化の進行を抑制することが分かった。

また、摘出した肝組織を観察したところ、コントロール群では線維化により肝表面の光沢が失われ、凹凸が明瞭であるのに対し、7-12SF d-F投与群では明らかに線維化が抑制されていた。

表3

ハイドロキシプロリン量*			
	n	μg/g肝	mg/肝全体
コントロール群（8週間）	11	286±40	4.83 ± 0.71
コントロール群（4週間）	8	193±11	2.70 ± 0.17
7-12SF d-F投与群			
100mg/kg	8	199±43	3.11 ± 0.79
30mg/kg	8	199±34	3.08 ± 0.53
正常対照群	5	77± 5	1.14 ± 0.11

* : 平均値±標準誤差

実施例3 フコイダンのアルコール摂取肝障害抑制効果

5週齢の雄性Crj:CD(SD)系ラット(日本チャールズ・リバー社)を購入し、飼料は液体飼料(日本クレア社製)を使用した。製造例1-(1)記載のガゴメコンブ由来フコイダンを水道水に溶解し、経口投与した(投与量は表

4に示す）。コントロール群には水道水を与えた。ガゴメコンブ由来フコイダン供与開始日を第0日目とし、第7日目からCE-2飼料にエタノールを終濃度5%となるように添加し、アルコール食として摂取させた。

肝障害抑制化の評価は、血清生化学検査によって行った。すなわち、第35日に採血を行い、ヘパリン処理後、遠心分離にて血漿を得、血清生化学検査により血中マーカー（GOT、GPT、 γ GTP）を測定した。また、肝臓を摘出し、10%中性ホルマリン緩衝液で固定し、パラフィン包埋してヘマトキシリン・エオシン染色し、病理学的観察を行った。GOT、GPT、および γ GTPの測定試薬はそれぞれS.TA-HR II GOT 7070、S.TA-HR II GPT 7070、およびLタイプワコー γ GTP（すべて和光純薬工業社）測定キットを用いた。また、第35日に採血後絶食にし、第36日にエーテル麻酔下腹部大動脈から採血を行い、ヘパリン処理をした。遠心分離後、血清を得、血清生化学検査により血中マーカー（HDL、LDL、VLDL）を測定した。HDL、LDL、およびVLDLの測定は電気泳動法により行った。尚、試験期間中、飼料摂取量ならびに飲水量の各群間の差はなかった。

その結果、ガゴメコンブ由来フコイダンの経口投与によってアルコールによるGOT、GPT、および γ GTPの上昇が抑制され、かつ血中コレステロールの中でいわゆる悪玉コレステロールとされるVLDLの割合の増加が抑制され、善玉コレステロールとされるHDLの割合の減少が抑制された。さらに肝臓の病理所見から、肝細胞の損傷・壊死・び慢性増殖が明らかに抑制されることも分かった。これらの結果を表4に示す。

以上の結果より、ガゴメコンブ由来フコイダンがアルコールによる肝障害を抑制することが分かった。

表4 ガゴメコンブ由来フコイダンのラットにおけるアルコール摂取肝障害抑制効果

マーカー	ガゴメコンブ由来フコイダン (mg/rat/day)		
	0	0.5	5
GOT (IU/L)	108±12	93±5.5	84±4.2
GPT (IU/L)	63±8.5	51±6.4	37±6.7
γGTP (IU/L)	1.7±0.39	1.4±0.16	1.0±0.35
HDL (%)	60±1.8	62±2.3	70±7.4
LDL (%)	21±2.0	23±3.6	15±6.5
VLDL (%)	16±1.6	11±0.75	13±2.8
び慢性肝細胞増殖	2/9	0/8	0/7
び慢性肝細胞壊死	2/9	0/8	1/7

平均値±標準誤差 (P < 0.05)

実施例4 フコイダンのアルコール摂取肝障害抑制効果

第35日目まで実施例3と同様の方法で飼育し、その後絶食して、第36日にエーテル麻酔下腹部大動脈から採血を行い、ヘパリン処理をした。遠心分離後、血清を得、血清生化学検査によりトリグリセリド値を測定した。トリグリセリド値の測定はトリグリセライドE-テストワコー（和光純薬工業社製）を用いて測定した。尚、試験期間中、飼料摂取量ならびに飲水量の各群間の差はなかった。

その結果、トリグリセリド値はコントロール群と比較して、強い低下傾向を示した。この結果を表5に示す。

以上の結果より、ガゴメコンブ由来フコイダンがアルコールによる肝障害を抑制することが分かった。

表5

マーカー	ガゴメコンブ由来フコイダン (m g / r a t / d a y)			
	0	0.5	5	50
トリグリセリド値	25.5±3.55	19.8±3.1	22.5±3.14	15.1±1.86
平均値±標準誤差 (P < 0.05)				

実施例5 フコイダンの血糖値上昇抑制効果

日本チャールズ・リバー株式会社より5週齢の雄性C r j : CD (SD) 系ラット (SPF動物) を購入した。製造例1-(1)記載のフコイダンを水道水に溶かしてフコイダン溶液を調製し、ラットに自由摂取させた。このときフコイダン溶液の濃度は0.005%、0.05%、0.5%を設定した。また、対照には水道水を与えた。飼育後10日目に、前日から18~20時間絶食した動物を用い、液体飼料(グルコース2g/kg)のみを経口投与した。採血は飼料投与前、投与0.5、1、2および3時間後に尾静脈より行い、ヘパリン処理した。その後、遠心分離により血漿を得、血糖量を測定した。その結果を第2図に示す。なお、血糖量はグルコース投与前の対象のラットの血糖量を100%として算出した。第2図はフコイダンによる食後のラットの血糖値上昇抑制作用を示す図であり、縦軸は血糖量(%)、横軸は経過時間(時間)を示す。これにより、フコイダン経口投与による血糖値上昇抑制作用が認められた。

また、同様にして6時間までの総血糖量について比較したところ、フコイダン投与群の方がコントロールに比べて、明らかに血糖値の上昇が抑制されていた。

実施例6 フコイダンの血中の中性脂肪値上昇抑制効果

実施例5と同様の方法で、飼育19日目にオリーブオイル添加液体飼料をオリーブオイルが5ml/kgとなるように経口投与し、飼料投与前、1、2時間後に採血し、トリグリセリド量を測定した。その結果を第3図に示す。なお、トリグリセリド量はオリーブオイル添加液体飼料前の対照ラットのトリグリセリド量

を100%として算出した。第3図はフコイダンによる食後のラットの血中の中性脂肪値上昇抑制作用を示す図であり、縦軸はトリグリセリド量(%)、横軸は経過時間(時間)を示す。これにより、フコイダン経口投与による血中の中性脂肪値上昇抑制作用が認められた。

また、同様にして6時間までの血中の総トリグリセリド量について比較したところ、フコイダン投与群の方がコントロールに比べて、明らかに血中の総トリグリセリド量の上昇が抑制されていた。

実施例7

ワカメメカブ(乾燥品、5mmφパスまで破碎)30gを脱塩水970gへ入れ、還元剤としてアスコルビン酸Naを0.005%w/w、0.01%w/w、0.02%w/w、0.05%w/w、0.08%w/w、0.1%w/w、0.5%w/w、1.0%w/wになるように添加した。対照は、アスコルビン酸Na無添加とした。抽出は95°Cで1時間、時々ゆるく攪拌して行なった。固液分離は、濾過助剤(セライト)を2%添加後、フィルターペーパーNo.2(東洋濾紙)さらに0.45μmφポアサイズメンブレンフィルターを用いる濾過により行い、ワカメメカブ抽出液を得た。

得られた抽出液について、ヨード含量測定及び官能評価を行った。

その結果を表6に示す。官能評価は10名のパネルメンバーで、5段階(1良～5悪)で行い、その平均値で表示した。

表 6 ワカメメカブ抽出液のヨード含量及び官能評価

項目	添加還元剤（アスコルビン酸Na、%w/w）								
	0 対照	0.005	0.01	0.02	0.05	0.08	0.1	0.5	1.0
ヨード含量 (mg%, w/v)	5.8	5.5	5.4	5.4	4.9	4.6	4.5	4.4	5.0
移行率 (%)	100	95	93	91	84	79	78	76	86
官能評価									
香り	3.0	2.4	2.3	2.1	1.9	2.0	2.0	2.2	2.3
味	3.2	2.7	2.4	1.8	1.7	1.9	1.9	2.0	3.2
色	3.5	3.2	3.1	3.0	3.1	3.2	3.3	3.2	3.2
総合	3.3	2.8	2.5	2.3	2.2	2.4	2.4	2.5	2.5
評	海藻臭が強い、苦み強い	海藻臭幾分減少、やや苦みあり	海藻臭やや弱い、苦み弱い	海藻臭を含め全体に臭い少ない苦みなく、 スッキリした味、後味良好	同左	同左、フレッシュ感がやや低い	同左、フレッシュ感がやや低い	同左、フレッシュ感が少ない	海藻臭とは異なった臭いを生ずる、苦みなく、 単調な味、フレッシュ感が少ない

表 6 より、還元剤を添加して抽出したワカメメカブ抽出液は、還元剤を添加しない対照と比較して、添加量 0.02%w/w から 1.0%w/w では特に海藻臭が軽減され、苦味が著しく軽減されて、スッキリして後味が改善された。

官能評価の比較から香り、味、色、の総合ではアスコルビン酸Na 0.00

5 %w/wから1. 0 %w/w添加で対照3. 3に対し2. 8から2. 2であった。また総合評価値が2. 5以下を示す還元剤アスコルビン酸Na濃度は0. 0 1 %w/wから1. 0 %w/wであった。これらの結果より、好ましい還元剤添加量は0. 0 0 5 %w/wから1. 0 %w/wであり、さらに官能的に好適には0. 0 1 %w/wから0. 1 %w/wであることがわかった。色については、いずれも対照の緑褐色に比べ薄いか、または無色であった。またヨード含量は、還元剤を入れることにより抽出液への移行が少なくなり、還元剤無添加を100%とすると還元剤0. 0 0 5 %添加で5%のヨードの移行が、還元剤0. 0 1 %以上では、7%以上のヨードの移行が軽減できた（表中、移行率参照）。この結果は苦味の軽減と相関していると推測される。

実施例 8

ワカメメカブ（乾燥品、5 mm φパスまで破碎）9 gを脱塩水201 gへ入れ、還元剤としてアスコルビン酸Naを0. 0 2 %w/w添加し、抽出時間を1時間に設定し、種々の温度75、80、90、95、100、120及び130°Cで抽出した。得られた濾液については、実施例7と同様に処理し、官能評価を行った。その結果を表7に示す。

表7 抽出温度の検討

抽出温度 (°C)	官能評価				評
	香り	味	色	総合	
75	2. 6	2. 7	2. 7	2. 7	海藻臭が幾分減少 濃厚感がやや不足
80	2. 4	2. 2	2. 9	2. 5	海藻臭が相当減少 苦味減少、濃厚感がある
90	2. 3	1. 8	3. 0	2. 4	海藻臭を含め全体に臭い 少ない、苦味減少 スッキリ、後味よし
95	2. 1	1. 8	3. 0	2. 3	海藻臭を含め全体に臭い 少ない、苦味減少 スッキリ、後味よし
100	2. 1	1. 8	3. 0	2. 3	同上
120	2. 1	2. 2	3. 1	2. 5	海藻臭が少ない 苦みがわずかに残る
130	2. 4	2. 4	3. 3	2. 7	海藻臭以外の臭いが生成 する、苦味がわずかに残る

表7より、ワカメメカブ抽出の温度は75から100°Cまでは、官能評価による高い総合の評価値が得られた。また、100°C超ではかえって官能評価による総合評価値は低下し、130°C抽出では総合評価値は75°Cと同水準となった。したがって、抽出温度の範囲は75°Cから130°Cが好ましく、官能的品質からは80°Cから100°Cがさらに好ましいことがわかった。

実施例9

ワカメメカブ（乾燥品、5mmΦパスまで破碎）9gを脱塩水201gへ入れ、還元剤としてアスコルビン酸Naを0.02%w/w添加し、抽出温度を95°Cに設定し、抽出時間を0.5、1、3、5時間とした。得られた濾液については、実施例7と同様に処理し、官能評価を行った。その結果を表8に示す。

表8 抽出時間の検討

抽出時間 (時間)	官能評価				評
	香り	味	色	総合	
0. 5	2. 4	2. 0	3. 0	2. 5	海藻臭が少ない、旨味良好 苦味わずかに残る
1	2. 1	1. 8	3. 0	2. 3	海藻臭を含め全体に臭い少 ない、苦味減少、スッキリ、 後味よし
3	2. 1	1. 8	3. 2	2. 4	同上
5	2. 5	2. 5	3. 2	2. 7	海藻臭以外の臭いがわずか に生成、わずかにザラツキ 感が口に残る

表8より、ワカメメカブ抽出時間において、海藻臭が少なく、旨味良好、苦味がわずかに残る効果を示すのは、0. 5時間抽出であった。また1時間抽出で官能評価の総合の値は最も優れており、さらに抽出するとこの値が高くなったが、5時間抽出でも海藻臭の低減効果が認められた。したがって、抽出時間は0. 5時間から5時間が好適であることがわかった。

実施例10

pHの影響について調べた。実施例9に準じて、抽出溶媒のpHを3. 0、4. 0、5. 0、6. 0、及び7. 0にクエン酸または重曹で調整して、95°Cで、1時間抽出を行った。その結果、得られた抽出液の海藻臭は、すべてにおいて減少することを確認した。味については、添加クエン酸や重曹の影響が出ることから比較しなかった。したがって、抽出時のpHは、海藻臭の低減からはpH 3. 0から7. 0が好適であることがわかった。

実施例11

ワカメメカブ(乾燥品、5mmφパスまで破碎)0. 6kgを脱塩水20リットルに入れ、還元剤アスコルビン酸Naは脱塩水に対して0. 02%w/wにな

るよう添加した。対照は、還元剤無添加とした。攪拌しつつ加温し、95°Cで保持して1時間後、室温まで冷却した。濾過は濾紙(ADVANTEC #327)を使用し、プレコートとして濾過助剤(Silika #600S, 20g)を用い、ボディフィードとして濾過助剤(Celite #545, 45g)を用いて常法に従って行った後、1μmφポアサイズメンブレンフィルターで濾過した。濾過液は19.4リットルを得た。殺菌は120°Cで60秒間行い、得られた殺菌液を減圧濃縮(40°C、750mmHg)して、2.6リットル(7.58倍)(22.7%)の濃縮液を得た。濃縮液の一部(1リットル)を凍結乾燥して9gの粉末を得た。この操作を5回行った。得られた濃縮液の分析値を表9に示す。

表9 濃縮液の分析

項目	本発明品	対照品
pH	5.35	5.36
酸度(0.1N NaOHml/10ml)	0.24	0.23
ホルモール態窒素(mg%, w/v)	109.4	110.0
全窒素(mg%, w/v)	222.5	231.0
直接還元糖(mg%, w/v)	0.24	0.24
全還元糖(mg%, w/v)	1.78	1.80
フコイダン(%, w/v)	2.88	2
NaCl(%, w/v)	3.48	3.41
ヨウ素(mg%, w/v)	4.15	4.95
7.7倍希釈での官能評価 (濃縮液1に対して蒸留水6.7容量比)	海藻臭が少ない、 苦味感じない、 フレッシュ感あり	海藻臭が強い、 苦味強い

表9より、本発明のワカメカブからの抽出液の濃縮液は、対照に比べると一般的な分析値はほぼ同水準の値を示したが、ヨウ素に関しては、含量が対照の84%となり15%以上の減少効果が得られた。蒸留水で7.7倍に希釈した液の官能評価では、本発明品が対照品に比べて、海藻臭が少なく、フレッシュ感があり、苦味が感じられなくなるという香味の点で著しい効果が得られた。

実施例12

ガゴメコンブ、マコンブ及びワカメ葉状体（それぞれ乾燥品、5mmφパスまで破碎）9gをそれぞれ脱塩水201gへ入れ、還元剤としてアスコルビン酸Naを0.02%w/w添加し、抽出温度を95°Cに設定し、抽出時間1時間で抽出した。対照は、アスコルビン酸Na無添加のものを同様に処理した。得られた濾液については、実施例7と同様に処理し、官能評価を行った。その結果を表10に示す。

表10 官能評価

		香り	味	色	総合	評
ガゴメコンブ	本発明品	2. 8	2. 7	3. 1	2. 9	海藻臭が少なく 苦味なし
対照		3. 3	3. 8	3. 6	3. 6	海藻臭と 苦味あり
マコンブ	本発明品	2. 7	2. 5	2. 7	2. 6	海藻臭軽減 旨味がさえる
対照		3. 4	3. 2	3. 3	3. 3	海藻臭と、やや 苦味が残る
ワカメ葉状体	本発明品	2. 4	2. 4	2. 9	2. 6	海藻臭が少なく 苦味なし
対照		3. 0	3. 2	3. 5	3. 2	海藻臭があり 苦味あり

表10より、ガゴメコンブ、マコンブ及びワカメ葉状体においてもワカメメカブと同様に、還元物質の存在下での抽出では、海藻臭が軽減され、苦味も除去できるので香味とも改善され、フレッシュ感があった。本発明品は、海藻の種類によらず、食材として嗜好にかなう好適な抽出物であった。

実施例13

褐藻類のガゴメコンブ4 g（乾燥品、5 mmφパスまで破碎）に塩化カルシウム 100 mmol/Lリットルを含む脱塩水を入れ、還元剤としてアスコルビン酸Naを0.01%w/w、0.05%w/w、0.10%w/w、0.20%w/w又は0.50%w/w添加して、95℃で2時間抽出後、フィルターパーパーNo. 2（東洋滤紙）で滤過した。滤液中のフコイダン含量を、システイン

-硫酸法によりL-フコースを測定する方法を用いて測定した。対照は、アスコルビン酸Na無添加のものを用いた。その結果を表11に示す。

表11 フコイダン含量

アスコルビン酸Na (%w/w)	フコイダン濃度 (mg/m1濾液)
無添加 (対照)	0. 89 (100%)
0. 01	1. 11 (125%)
0. 05	1. 33 (149%)
0. 10	1. 33 (149%)
0. 20	1. 44 (161%)
0. 50	1. 45 (162%)

表11より、アスコルビン酸0.01~0.50%w/wまでは、フコイダンの抽出率が向上しており、対照の1.6倍まで上昇し、還元剤のアスコルビン酸存在下で、フコイダン抽出効率が向上していた。

次に、プロテアーゼ処理との組合せを検討した。すなわち、褐藻類のガゴメコンブ4g(乾燥品、5mmφバスまで破碎)及びプロテアーゼとして植物起源のパパイン(ナガセ生化学工業)、又は枯草菌起源SP-15FG(ナガセ生化学工業)を各40mg、100mmol/Lリットルの塩化カルシウムを含む脱塩水100mLとを混合し、12°Cから95°Cまで2時間で徐々に昇温し、酵素処理し、その後還元剤のアスコルビン酸Naを0.10%w/wになるように各々添加した。対照は、酵素のみ無添加のものを用いた。抽出は95°Cで2時間行い、抽出後、フィルターペーパーNo.2(東洋滤紙)を用いて滤過した。この滤過液のうち4mLを限外滤過膜(分子量10,000カット)で0.1mLまで脱塩濃縮した。この脱塩濃縮液へ脱塩水4mLを各々添加し、再び0.1mLまでに濃縮し、濃縮液へ脱塩水を加えて1mLとした。この液についてフコイダン含量及びケルダール窒素含量を測定した。また、この測定結果から原料のガゴメコンブ重量あたりのフコイダン収率(%) (フコイダン収率(%) = (濃縮液1mL中のフコイダン重量(g) × 25) / 原料ガゴメコンブ重量(g)) × 100

) を求めた。その結果を表 1 2 に示した。

表 1 2 フコイダン含量、窒素含量及びフコイダン収率

酵素	フコイダン 含量 (g/L)	全窒素 (mg/L)	比濁度* 660nm/ cmセル	フコイダン収率 (%)
対照	6. 0 5	6 4. 3	0. 1 5 8	3. 7 8
プロテアーゼ S P - 1 5 F G	8. 4 2	4 7. 8	0. 0 8 9	5. 2 6
パパイン	8. 2 9	2 9. 9	0. 1 0 8	5. 1 8

* ; フィルターペーパー N o. 2 (東洋滤紙) 濾過液を使用して測定

表 1 2 より、酵素プロテアーゼ処理とアスコルビン酸Naの抽出を組合せると、フコイダンの抽出効率はさらに向上することが確認でき、また、ガゴメコンブ由来のタンパク質も低分子化(分子量 10,000 以下)されて限外濾過で除去して低減でき、パパインの場合で対照の 1/2 以下となった。さらに、対照の抽出液の濁度は酵素プロテアーゼ処理により清澄化していた。これらの結果から、酵素プロテアーゼ処理とアスコルビン酸Na抽出によるフコイダン抽出により、収率の向上及びタンパク質の低減が可能となり、高純度なフコイダンを得ることができた。

実施例 1 4

(1) 褐藻類のガゴメコンブ 40 kg (乾燥品、5 mm φ パスまで破碎)、塩化カルシウム 15 kg、酵素パパイン 400 g (ナガセ生化学工業)、アスコルビン酸Na 1 kg を脱塩水に混合し、1000 リットルとした。酵素処理及び抽出は、80 分間かけて 15 °C から 60 °C まで昇温し、60 °C で 60 分間反応及び抽出を行なった。さらに、抽出は 80 分間かけて 60 °C から 95 °C まで昇温し、95 °C で 120 分間抽出を行なった。その後 24 時間かけて 9 °C に冷却し

本発明抽出処理物とした。この抽出処理物のフコイダン含量を測定し、原料のガゴメコンブあたりのフコイダン収率(%) (フコイダン収率(%) = (抽出処理物中のフコイダン重量(kg) / 原料ガゴメコンブ重量(kg)) × 100) を求めた。また対照は還元剤アスコルビン酸Na及び酵素パパインを添加せず同様に処理して得た。測定結果を表13に示す。

表13 抽出処理物中のフコイダン含量

	本発明抽出処理物	対照抽出処理物
フコイダン重量(kg)	2.07	1.81
フコイダン収率(%)	5.18	4.53

(2) 引き続き実施例14-(1)で得られた本発明抽出処理物の固液分離をフィルタープレスを用いて行い、800リットルの圧搾濾過液を得た。次に限外濾過処理及び脱塩処理を行い80リットルにまで濃縮した。この濃縮液を濾紙及びケイソウ土を用いる濾過機で濾過を行い、濾液77リットルを得た。さらに濾液を濃縮機(エバポール、CEP-30S、加熱温度90°C、品温40~45°C)を用いて濃縮して6.8リットルの濃縮液を得、121°C15分間オートクレーブで殺菌した。その殺菌液を凍結乾燥し、フコイダン 780gを得た。対照は還元剤アスコルビン酸Na及び酵素パパインを添加せず同様に処理して得た。本発明品及び対照の凍結乾燥品およびこれらの1%w/v水溶液(フコイダン溶液)の分析値をそれぞれ表14、表15に示す。

表14 凍結乾燥品の分析値

		本発明品	対照
水分	(g/100 g)	0.4	0.9
タンパク質 ^a	(g/100 g)	2.6	9.0
脂質	(g/100 g)	0.1	0.2
灰分	(g/100 g)	31.8	29.4

a ; ケルダール窒素×6.25 (タンパク質係数)

表15 フコイダン溶液

	本発明品	対照
フコイダン (mM)	21.4	20.0
全糖 (mM, フコース換算)	27.8	23.5
硫酸基 (mM)	34.2	28.5

表14より、酵素プロテアーゼ処理とアスコルビン酸Na抽出の組合せによってフコイダンの抽出効率が向上したことが確認できた。さらに表14から明らかなように、本発明品のタンパク質含量は顕著に減少した。また、表15から本発明の方法により高純度のフコイダンを得ることができた。

また、本発明品の外観の色について調べたところ、本発明品は対照の緑褐色に比べて色が薄く、白っぽい緑褐色になった。すなわち、本発明品及び対照品を蒸留水でフコイダン含量2g/Lになるように調製し、その660nmの吸光度を測定したところ、本発明品と対照はそれぞれ0.017と0.036であり、本発明品は緑の着色成分が低減されていることが分かった。

また、本発明品の海藻臭の程度についても調べたところ、本発明品は対照に比べて、海藻臭が低減されていた。すなわち、得られた対照を20°C蒸留水を用い

て0.5%w/v溶液を調製し、それと同等の臭い強度を示す本発明品の溶液濃度を5名のパネルメンバーで求めたところ、本発明品では2.6%であり、本発明品は対照に比べて、海藻臭が低減されていることが分かった。

実施例15

実施例11の本発明及び対照のワカメメカブ抽出液の濃縮液を用いて、表16に示す配合表のワカメメカブ抽出飲料を調製した。

表16 ワカメメカブ抽出飲料

	本発明品 (%)	対照品 (%)
還元剤処理ワカメメカブ抽出液（濃縮）	1.8	0
還元剤無処理ワカメメカブ抽出液（濃縮）	0	1.8
トレハロース	2.5	2.5
1/5 リンゴ果汁	1.7	1.7
1/5 レモン果汁	0.13	0.13
ビタミンC	0.04	0.04
水	残部	残部
pH	4.0	4.0
酸度 0.1N NaOH/20ml	3.72	3.72
ブリックス	5.5	5.5

pHはクエン酸で調整

表16の配合により得られた、それぞれの飲料は200ml容缶に充填し、115°Cで15分間加熱殺菌し、缶詰品を調製した。官能評価は実施例7と同様にして実施した。パネルメンバーは10名で、5段階評価（1良～5悪）を用い、

平均値を求めた。その結果を表17に示す。

表17 官能評価

	本発明品	対照品
味	2. 6	3. 3
香り	2. 4	3. 4
色調	2. 6	2. 9
総合	2. 5	3. 2

表17より、本発明品のワカメメカブ抽出物の濃縮物を用いた飲料は、対照品に比べ、海藻臭がなく、苦味がないので甘味、酸味及び旨味のバランスがよく、後味がすっきりして新規な香味の海藻飲料となった。対照品は、ワカメメカブ由来の海藻臭がきつく、また苦味が舌に残り、香味バランスがくずれ、後味も悪かった。また、本発明品は対照品に比べて色調も良好であった。

実施例16

ワカメメカブの抽出液を用いたスープを調製した。ワカメメカブ抽出液（濃縮）は実施例11の3%ワカメメカブの抽出液を7.58倍に濃縮したもの（22.7%ワカメメカブ抽出液に相当）を用い、本発明品は還元処理したもの、対照には無処理のものを用いた。表18にワカメメカブ抽出液（濃縮）入りスープの配合を示す。この配合に従って、スープを調製し、200ml缶に充填して120°C、15分間加熱殺菌を行い、缶詰品とした。官能評価は実施例7と同様にして実施した。パネルメンバーは10名で、5段階評価（1良～5悪）を用い、平均値を求めた。その結果を表19に示す。

表18 ワカメメカブ（濃縮）スープの配合

	本発明品（%）	対照品（%）
還元剤処理ワカメメカブ抽出液（濃縮）	1.0	0
還元剤無処理ワカメメカブ抽出液（濃縮）	0	1.0
低強度寒天*	0.25	0.25
乳清ミネラル	0.60	0.60
ポークエキス	0.13	0.13
砂糖	0.10	0.10
胡椒	0.0005	0.0005
ビタミンC	0.02	0.02
水	残部	残部
pH	5.0	5.0

*伊那食品工業社製

pHはクエン酸又はクエン酸ナトリウムで調整

表19 官能評価

スープ	項目			総合
	味	香り	色調	
本発明品	2.9	2.7	3.0	2.9
対照品	3.6	3.7	3.3	3.5

表19より、本発明品は対照に比べて後味がよく、スッキリした味に仕上がり、ワカメメカブ抽出液の香味がポークエキスと良く馴染み、ポークエキス単独では味わえない、新規な味となり、全体の香味バランスを整えた。対照は海藻臭が残り、ポークエキスと調和がくずれ、また苦味がわずかに残り、香味全体のバランスをくずす傾向にあった。このように、調理の面から見て、本発明品のワカメメカブ抽出物は、その香味の特性から調味料として優れていることが明らかとな

った。また、色調も、本発明品は対照品に比べて良好であった。

実施例 1 7

ふりかけとして魚粉 2.4 kg、食塩 0.5 kg、グルタミン酸ソーダ 0.3 kg を混合（計 3.2 kg）し、本発明品及び対照として実施例 1 1 で得られたワカメメカブの抽出物の凍結乾燥品を上記ふりかけ 1 kg当たり 5 g をそれぞれ添加し、及び無添加で常法に従って造粒した。これらそれぞれの造粒品約 3.2 kg に対してごま 1.2 kg をよく混合して調製した。これらのふりかけを米飯にふりかけ、官能評価を実施例 7 と同様にして行った。その結果、本発明品は対照に比べ、魚粉やゴマの香味と旨味が調和し、隠し味として機能を有することがわかった。対照は海藻臭がわずかに残り、魚粉及びゴマの香りのバランスをくずし、また、苦味が口にわずかに残った。本発明品は総合して、ふりかけの品質を向上させることができた。

実施例 1 8

ふりかけとして魚粉 2.4 kg、食塩 0.5 kg、グルタミン酸ソーダ 0.3 kg を混合（計 3.2 kg）し、本発明品及び対照としての実施例 1 1 で得られたワカメメカブの抽出物の上記ふりかけ 1 kgあたり 5 g をそれぞれ添加し、及び実施例 1 4 で得られたガゴメコンブ由来のフコイダン 1 g を本発明品のみに添加した。これらのふりかけを米飯にふりかけ、官能評価を実施例 7 と同様にして行った。その結果、本発明品は対照に比べ魚粉やゴマの香味と旨味が調和し、対照に比べバランスのとれた風味で、ワカメ風味が引き立っていた。両者を組合せるとふりかけの品質がさらに向上した。

実施例 1 9

表 20 の配合で、打錠機を用い、打錠時の圧力 3000 kg/cm² で常法に

従い錠菓を作製した。本発明品には、実施例14で得られたプロテアーゼ処理還元抽出フコイダンを用い、対照は実施例14で得られた対照のフコイダンを用いた。その結果、本発明品は、口に含んだときコンブ臭が無く、全体の味のバランスが向上し、舌触りが滑らかであった。

表20 配合表

		本発明品	対照品
対照フコイダン	(m g)	0	100
本発明フコイダン	(m g)	100	0
デキストリン	(m g)	100	100
還元麦芽糖水飴	(m g)	715	715
乳糖	(m g)	223	223
カカオパウダー	(m g)	78	78
香料	(m g)	19	19
ショ糖脂肪酸エステル (m g)		65	65

寄託された生物材料

(1) 寄託機関の名称・あて名

独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター

日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6（郵便番号305-8566）

(2) 寄託された微生物

(i) アルテロモナス (*Alteromonas*) s.p. SN-1009

原寄託日 : 1996年2月13日

国際寄託への移管請求日 : 1996年11月15日

受託番号: FERM BP-5747

(ii) フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) s.p. SA-0082

原寄託日 : 1995年3月29日

国際寄託への移管請求日 : 1996年2月15日

受託番号: FERM BP-5402

産業上の利用可能性

本発明により、フコイダン、その分解物及びそれらの塩からなる群より選択される1つ以上を有効成分として含有する生体の恒常性維持剤が提供される。該医薬は、前記有効成分により生体の恒常性維持作用を發揮し、肝機能障害の治療剤又は予防剤、血液の恒常性維持剤として有用である。また、本発明により、前記有効成分の有する生体の恒常性維持作用を利用した食品、飲料又は飼料が提供される。

更に本発明は、海藻臭の低減された、食品等の原料として有用なフコイダン及び海藻類抽出物、高純度で高収率のフコイダンの製造方法及び海藻類抽出物の製造方法、ならびにそれらのフコイダン及び／又は海藻類抽出物を含有してなる、食品、飲料、調味料、飼料、化粧料及び医薬を提供する。

請求の範囲

1. フコイダン、その分解物及びそれらの塩からなる群より選択される 1 つ以上を有効成分として含有することを特徴とする生体の恒常性維持剤。
2. 肝機能障害の治療剤又は予防剤である請求項 1 記載の生体の恒常性維持剤。
。
3. 肝機能障害が肝線維化を伴う疾患である請求項 2 記載の生体の恒常性維持剤。
4. 血液の恒常性維持剤である請求項 1 記載の生体の恒常性維持剤。
5. 血糖値上昇抑制作用を有する請求項 4 記載の生体の恒常性維持剤。
6. 血中の中性脂肪値上昇抑制作用を有する請求項 4 記載の生体の恒常性維持剤。
7. 飲食後における血液の恒常性維持作用を有する請求項 4 ~ 6 いずれか 1 項に記載の生体の恒常性維持剤。
8. フコイダン、その分解物及びそれらの塩からなる群より選択される 1 つ以上を含有することを特徴とする生体の恒常性維持用の食品、飲料又は飼料。
9. 肝機能障害の改善又は予防用である請求項 8 記載の食品、飲料又は飼料。

10. 肝機能障害が肝線維化を伴う疾患である請求項9記載の食品、飲料又は飼料。

11. 血液の恒常性維持用の食品、飲料又は飼料である請求項8記載の食品、飲料又は飼料。

12. 血糖値上昇抑制作用を有する請求項11記載の食品、飲料又は飼料。

13. 血中の中性脂肪値上昇抑制作用を有する請求項11記載の食品、飲料又は飼料。

14. 飲食後における血液の恒常性維持作用を有する請求項11～13いずれか1項に記載の食品、飲料又は飼料。

15. 海藻類を還元性物質の存在下で抽出して得られるフコイダン。

16. 還元性物質がアスコルビン酸、アスコルビン酸塩、エリソルビン酸、エリソルビン酸塩、システイン及びグルタチオンからなる群より選択される1つ以上の還元性物質である請求項15記載のフコイダン。

17. 抽出が温水又は溶剤を用いて行われるものである請求項15又は16記載のフコイダン。

18. 抽出が30°C～130°Cにおいて5分間～32時間行われるものである請求項15～17いずれか1項に記載のフコイダン。

19. 海藻類が予めプロテアーゼ処理されたものである、及び／又は抽出工程においてプロテアーゼ処理されるものである請求項15～18いずれか1項に記載のフコイダン。

20. フコイダンが請求項15～19いずれか1項に記載のフコイダンである請求項1～7いずれか1項に記載の生体の恒常性維持剤。

21. フコイダンが請求項15～19いずれか1項に記載のフコイダンである請求項8～14いずれか1項に記載の食品、飲料又は飼料。

22. 海藻類を還元性物質の存在下で抽出して得られる海藻類抽出物。

23. フコイダンを含有してなる請求項22記載の海藻類抽出物。

24. 還元性物質がアスコルビン酸、アスコルビン酸塩、エリソルビン酸、エリソルビン酸塩、システイン及びグルタチオンからなる群より選択される1つ以上の還元性物質である請求項22又は23記載の海藻類抽出物。

25. 抽出が温水又は溶剤を用いて行われるものである請求項22～24いずれか1項に記載の海藻類抽出物。

26. 抽出が30°C～130°Cにおいて5分間～32時間行われるものである請求項22～25いずれか1項に記載の海藻類抽出物。

27. 海藻類が予めプロテアーゼ処理されたものである、及び／又は抽出工程においてプロテアーゼ処理されるものである請求項22～26いずれか1項に記

載の海藻類抽出物。

28. 請求項15～19いずれか1項に記載のフコイダン及び／又は請求項22～27いずれか1項に記載の海藻類抽出物を含有してなることを特徴とする食品、飲料、調味料又は飼料。

29. 請求項15～19いずれか1項に記載のフコイダン及び／又は請求項22～27いずれか1項に記載の海藻類抽出物を含有してなることを特徴とする化粧料。

30. 請求項15～19いずれか1項に記載のフコイダン及び／又は請求項22～27いずれか1項に記載の海藻類抽出物を有効成分として含有してなることを特徴とする医薬。

31. コレステロール低下用医薬、血液清澄用医薬、抗血液凝固用医薬、抗がん用医薬、抗エイズウイルス用医薬、又は抗潰瘍用医薬である請求項30記載の医薬。

32. 海藻類を還元性物質の存在下で抽出する工程を包含することを特徴とするフコイダンの製造方法。

33. 還元性物質がアスコルビン酸、アスコルビン酸塩、エリソルビン酸、エリソルビン酸塩、システイン及びグルタチオンからなる群より選択される1つ以上の還元性物質である請求項32記載のフコイダンの製造方法。

34. 抽出を温水又は溶剤を用いて行う請求項32又は33記載のフコイダン

の製造方法。

35. 抽出を30°C～130°Cにおいて5分間～32時間行う請求項32～34いずれか1項に記載のフコイダンの製造方法。

36. 海藻類を予めプロテアーゼ処理する、及び／又は抽出工程においてプロテアーゼ処理する請求項32～35いずれか1項にフコイダンの製造方法。

37. 海藻類を還元性物質の存在下で抽出する工程を包含することを特徴とする海藻類抽出物の製造方法。

38. 海藻類抽出物がフコイダンを含有してなるものである請求項37記載の海藻類抽出物の製造方法。

39. 還元性物質がアスコルビン酸、アスコルビン酸塩、エリソルビン酸、エリソルビン酸塩、システイン及びグルタチオンからなる群より選択される1つ以上の還元性物質である請求項37又は38記載の海藻類抽出物の製造方法。

40. 抽出を温水又は溶剤を用いて行う請求項37～39いずれか1項に記載の海藻類抽出物の製造方法。

41. 抽出を30°C～130°Cにおいて5分間～32時間行う請求項37～40いずれか1項に記載の海藻類抽出物の製造方法。

42. 海藻類を予めプロテアーゼ処理する、及び／又は抽出工程においてプロテアーゼ処理する請求項37～41いずれか1項に記載の海藻類抽出物の製造方

法。

4 3. 請求項 3 2～3 6 いずれか 1 項において記載の工程及び／又は請求項 3 7～4 2 いずれか 1 項において記載の工程を包含することを特徴とする食品、飲料、調味料又は飼料の製造方法。

4 4. 請求項 3 2～3 6 いずれか 1 項において記載の工程及び／又は請求項 3 7～4 2 いずれか 1 項において記載の工程を包含することを特徴とする化粧料の製造方法。

4 5. 請求項 3 2～3 6 いずれか 1 項において記載の工程及び／又は請求項 3 7～4 2 いずれか 1 項において記載の工程を包含することを特徴とする医薬の製造方法。

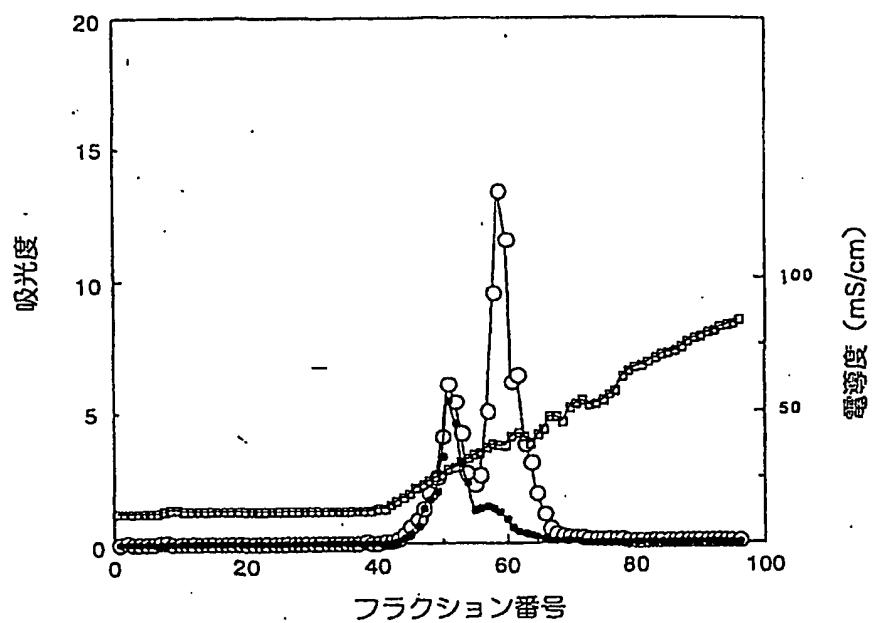
4 6. 医薬がコレステロール低下用医薬、血液清澄用医薬、抗血液凝固用医薬、抗がん用医薬、抗エイズウイルス用医薬、又は抗潰瘍用医薬である請求項 4 5 記載の医薬の製造方法。

4 7. 無臭性又は海藻臭の低減された請求項 1 5～1 9 いずれか 1 項に記載のフコイダン。

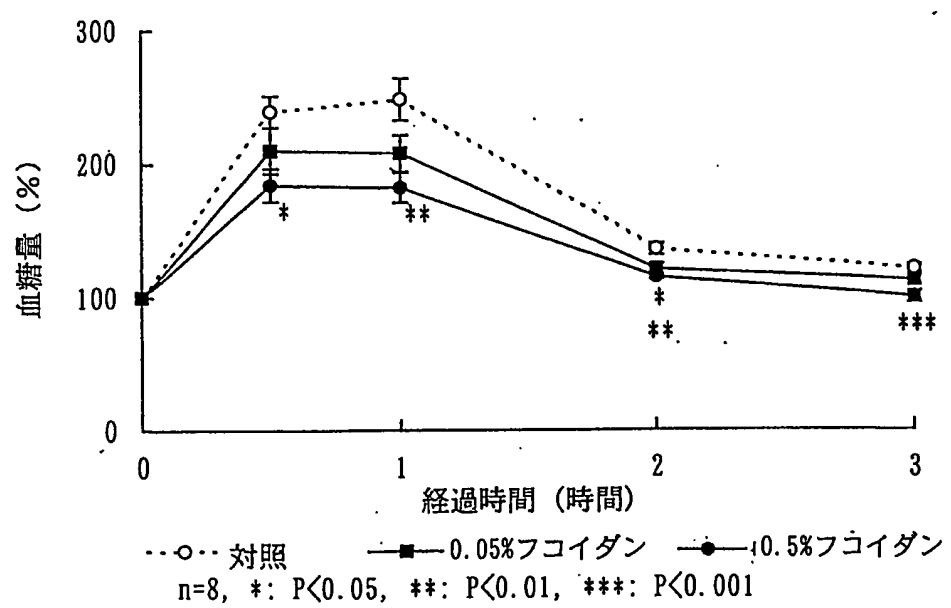
4 8. 無色性又は海藻由来の緑褐色の低減された請求項 1 5～1 9 いずれか 1 項に記載のフコイダン。

4 9. 無臭性又は海藻臭の低減された請求項 2 2～2 7 いずれか 1 項に記載の海藻類抽出物。

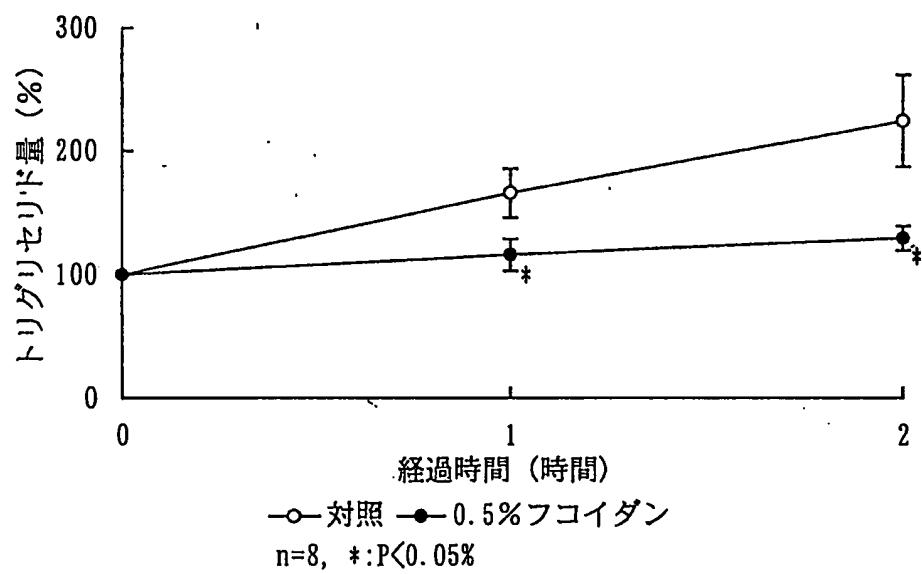
50. 無色性又は海藻由来の緑褐色の低減された請求項22～27いずれか1項に記載の海藻類抽出物。



第 1 図



第2図



第3図

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07894

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/737, 35/80, A61P43/00, 1/16, 3/08, 3/06, 35/00, 31/18, 1/04, A23L2/52, 1/29, A23K1/16, C08B37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/737, 35/80, A61P43/00, 1/16, 3/08, 3/06, 35/00, 31/18, 1/04, A23L2/52, 1/29, A23K1/16, C08B37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), JICST (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/50464 A1 (Takara Shuzo Co., Ltd.), 31 August, 2000 (31.08.00),	1-7, 15-20, 30, 31, 47, 48
Y	abstract; Claims; page 21, lines 14 to 18 & JP 2001-224369 A & JP 2001-226392 A	8-14, 21-28, 32-46, 49, 50 29
A		
X	KHOTIMCHENKO, Yu. S. et al., "The efficiency of dietary non-starch polysaccharides in experimental toxic hepatitis", Vopr. Pitan. January-April, 2000, Vol.69, No.1/2, pages 22 to 26 especially, abstract	1-7, 15-20, 30, 31, 47, 48 8-14, 21-29, 32-46, 49, 50
Y		29
A		
X	LI, Deyuan et al., "Effect of fucoidin on blood glucose in alloxan-induced diabetic mice", Huazhong Nongye Daxue Xuebao, (1999), Vol.18, No.2, pages 191 to 193, especially, abstract	1-5, 7, 15-20, 30, 47, 48 8-14, 21-29, 31-46, 49, 50 6, 29
Y		
A		

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
11 December, 2001 (11.12.01)Date of mailing of the international search report
25 December, 2001 (25.12.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07894

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/41288 A1 (Takara Shuzo Co., Ltd.), 19 August, 1999 (19.08.99), abstract; Claims; page 3, line 9 to page 7, line 8 & EP 1057833 A1 & JP 2001-261704 A & AU 9924401 A1	1-4, 6, 15-20, 29-31, 47, 48 8-14, 21-28, 32-46, 49, 50 5
X	EP 916269 A1 (Takara Shuzoh Co., Ltd.), 19 May, 1999 (19.05.99), abstracts; Claims; Par. No. [0020] & WO 97/47208 A1 & AU 9727898 A1 & AU 711896 B2 & CN 1221320 A & KR 2000010670 A	15-19, 28, 47, 48
X	EP 919237 A1 (Takara Shuzoh Co., Ltd.), 02 June, 1999 (02.06.99), the whole document & WO 97/26896 A1 & US 6207652 B1 & US 2001034335 A1 & JP 2001-218580 A & JP 2001-226407 A & JP 2001-226408 A & JP 2001-224394 A2 & AU 9673555 A1 & CA 2243543 A & AU 9713999 A1 & AU 720004 B2 & CN 1209749 A	15-19, 47, 48
Y	GB 2219484 A (Yoshio TANAKA),	22-46, 49, 50
A	13 December, 1989 (13.12.89), Claims & DE 3905866 A & JP 1-218573 A & FR 2627672 A & AU 8822122 A & US 4913915 A & GB 2219484 B & DE 3905866 C & IL 87261 A & IT 1228458 A & JP 4-75753 B & CH 681416 A	15-21
Y	JP 8-66159 A (Miho TANAKA),	22-46, 49, 50
A	12 March, 1996 (12.03.96), Par. Nos. [0003], [0004] (Family: none)	15-21
Y	JP 61-57519 A (Kabushiki Kaisha Kibun Food Chemiphar.),	22-46, 49, 50
A	24 March, 1986 (24.03.86), Claims (Family: none)	15-21
Y	JP 61-57520 A (Kabushiki Kaisha Kibun Food Chemiphar.),	22-46, 49, 50
A	24 March, 1986 (24.03.86), Claims (Family: none)	15-21
PX	WO 01/13925 A1 (Takara Shuzo Co., Ltd.), 01 March, 2001 (01.03.01), abstract (Family: none)	15-19, 21, 47, 48
PA		1-14, 20
PX	WO 00/62785 A1 (Takara Shuzo Co., Ltd.), 26 October, 2000 (26.10.00), abstract; Claims (Family: none)	15-19, 21, 28-30, 47, 48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07894

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	LI, Fuchuan et al., "Hypoglycemic activity of 3 polysaccharides from Laminaria japonica", Zhongguo Haiyang Yaowu, (2000), Vol.19, No.5, pages 12 to 15, especially, abstract	1-5, 7, 15-20, 30, 47, 48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07894

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The technical feature of claims 1 to 21, 47 and 48 resides in fucoidan and a specific use of fucoidan, while the technical feature of claims 22 to 46, 49 and 50 resides in a method of extracting marine algae and the extraction method. Namely, these technical features are neither identical to each other nor correspond to each other. Such being the case, these inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' A61K31/737, 35/80, A61P43/00, 1/16, 3/08, 3/06, 35/00, 31/18, 1/04, A23L2/52, 1/29, A23K1/16, C08B37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' A61K31/737, 35/80, A61P43/00, 1/16, 3/08, 3/06, 35/00, 31/18, 1/04, A23L2/52, 1/29, A23K1/16, C08B37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN), JICST(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/50464 A1(竜酒造株式会社) 31. 8月. 2000 (31.08.00)Abstract, 請求の範囲, 第21ページ第14-18行, & JP 2001-224369 A & JP 2001-226392 A	1-7, 15-20, 30, 31, 47, 48
Y		8-14, 21-28, 32-46, 49, 50
A		29

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.12.01

国際調査報告の発送日

25.12.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

渡邉下告

4C 9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	KHOTIMCHENKO, Yu. S. et al, The efficiency of dietary non-starch polysaccharides in experimental toxic hepatitis, Vopr. Pitan. 2000 Jan-Apr, Vol.69, No.1/2, 22-26,特に、Abstract	1-7, 15-20, 30, 31, 47, 48
Y		8-14, 21-29, 32-46, 49, 50
A		29
X	LI, Deyuan et al, Effect of fucoidin on blood glucose in alloxan-induced diabetic mice, Huazhong Nongye Daxue Xuebao 1999, Vol.18, No.2, pp.191-193, 特に、Abstract	1-5, 7, 15-20, 30, 47, 48
Y		8-14, 21-29, 31-46, 49, 50
A		6, 29
X	WO 99/41288 A1(賣酒造株式会社) 19. 8月. 1999(19.08.99)Abstract, 請求の範囲, 第3行-第9行-第7行-第8行, & EP 1057833 A1 & JP 2001-261704 A & AU 9924401 A1	1-4, 6, 15-20, 29-31, 47, 48
Y		8-14, 21-28, 32-46, 49, 50
A		5
X	EP 916269 A1 (TAKARA SHUZO CO.LTD.) 19. 5月. 1999(19.05.99)Abstracts, Claims, [0020] & WO 97/47208 A1 & AU 9727898 A1 & AU 711896 B2 & CN 1221320 A & KR 2000010670 A	15-19, 28, 47, 48
Y		21-27, 43
X	EP 919237 A1(TAKARA SHUZO CO.LTD.) 2. 6月. 1999(02.06.99)文献全体 & WO 97/26896 A1 & US 6207652 B1 & US 2001034335 A1 & JP 2001-218580 A & JP 2001-226407 A & JP 2001-226408 A & JP 2001-224394 A2 & AU 9673555 A1 & CA 2243543 A & AU 9713999 A1 & AU 720004 B2 & CN 1209749 A	15-19, 47, 48
Y		22-46, 49, 50
A	CLAIMS & DE 3905866 A & JP 1-218573 A & FR 2627672 A & AU 8822122 A & US 4913915 A & GB 2219484 B & DE 3905866 C & IL 87261 A & IT 1228458 A & JP 4-75753 B & CH 681416 A	15-21
Y		22-46, 49, 50
A	JP 8-66159 A(田中 美穂) 12. 3月. 1996(12.03.96) 【0003】、【0004】 (ファミリーなし)	15-21

C(続き)	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	JP 61-57519 A(株式会社 紀文フードケミファ) 24. 3月. 1986(24.03.86)特許請求の範囲 (ファミリーなし)	22-46, 49, 50 15-21
Y A	JP 61-57520 A(株式会社 紀文フードケミファ) 24. 3月. 1986(24.03.86)特許請求の範囲 (ファミリーなし)	22-46, 49, 50 15-21
P X P A	WO 01/13925 A1(寶酒造株式会社) 1. 3月. 2001(01.03.01) Abstract (ファミリーなし)	15-19, 21, 47, 48 1-14, 20
P X []	WO 00/62785 A1(寶酒造株式会社) 26. 10月. 2000(26.10. 00)Abstract, 請求の範囲 (ファミリーなし)	15-19, 21, 28- 30, 47, 48
P X	LI, Fuchuan et al, Hypoglycemic activity of 3 polysaccharides from Laminaria japonica, Zhongguo Haiyang Yaowu , 2000, Vol.19, No.5, pp.12-15, 特に、ABSTRACT	1-5, 7, 15-20, 30, 47, 48

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT1.7条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-21、47、48の技術的特徴は、フコイダン及びフコイダンの特定の用途であり、請求の範囲22-46、49、50の技術的特徴は、海草類の抽出方法及びその抽出方法であるから、技術的特徴が、互いに同一でもなく、対応するものでもないから、單一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。